

VERÄNDERUNGEN  
DER PROLIFERATIONSKINETIK  
DES MENSCHLICHEN KNOCHENMARKS  
IN VIVO DURCH HYDROXYUREA

Erich Ertl

1902





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK III  
DES KLINIKUMS GROSSHADERN DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. W. WILMANN

VERÄNDERUNGEN DER PROLIFERATIONSKINETIK  
DES MENSCHLICHEN KNOCHENMARKS IN VIVO DURCH  
HYDROXYUREA

INAUGURAL - DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DER  
DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN AN DER  
LUDWIG - MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON  
ERICH ERTL  
AUS ERDING  
JAHR 1982

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Wilmanns

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.1982



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH  
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

# INHALTSVERZEICHNIS

|      |                                         |     |
|------|-----------------------------------------|-----|
| 1.   | Einleitung                              | 1   |
| 2.   | Charakteristika                         | 2   |
| 3.   | Methodische Grundlagen der Untersuchung | 3   |
| 4.   | Erhebungsinstrumente                    | 4   |
| 5.   | Erhebungsergebnisse                     | 5   |
| 6.   | Diskussion                              | 6   |
| 7.   | Fazit                                   | 7   |
| 8.   | Literaturverzeichnis                    | 8   |
| 9.   | Anhang                                  | 9   |
| 10.  | Meinen Eltern gewidmet                  | 10  |
| 11.  | Abkürzungen                             | 11  |
| 12.  | Statistische Verfahren                  | 12  |
| 13.  | Statistische Ergebnisse                 | 13  |
| 14.  | Statistische Ergebnisse                 | 14  |
| 15.  | Statistische Ergebnisse                 | 15  |
| 16.  | Statistische Ergebnisse                 | 16  |
| 17.  | Statistische Ergebnisse                 | 17  |
| 18.  | Statistische Ergebnisse                 | 18  |
| 19.  | Statistische Ergebnisse                 | 19  |
| 20.  | Statistische Ergebnisse                 | 20  |
| 21.  | Statistische Ergebnisse                 | 21  |
| 22.  | Statistische Ergebnisse                 | 22  |
| 23.  | Statistische Ergebnisse                 | 23  |
| 24.  | Statistische Ergebnisse                 | 24  |
| 25.  | Statistische Ergebnisse                 | 25  |
| 26.  | Statistische Ergebnisse                 | 26  |
| 27.  | Statistische Ergebnisse                 | 27  |
| 28.  | Statistische Ergebnisse                 | 28  |
| 29.  | Statistische Ergebnisse                 | 29  |
| 30.  | Statistische Ergebnisse                 | 30  |
| 31.  | Statistische Ergebnisse                 | 31  |
| 32.  | Statistische Ergebnisse                 | 32  |
| 33.  | Statistische Ergebnisse                 | 33  |
| 34.  | Statistische Ergebnisse                 | 34  |
| 35.  | Statistische Ergebnisse                 | 35  |
| 36.  | Statistische Ergebnisse                 | 36  |
| 37.  | Statistische Ergebnisse                 | 37  |
| 38.  | Statistische Ergebnisse                 | 38  |
| 39.  | Statistische Ergebnisse                 | 39  |
| 40.  | Statistische Ergebnisse                 | 40  |
| 41.  | Statistische Ergebnisse                 | 41  |
| 42.  | Statistische Ergebnisse                 | 42  |
| 43.  | Statistische Ergebnisse                 | 43  |
| 44.  | Statistische Ergebnisse                 | 44  |
| 45.  | Statistische Ergebnisse                 | 45  |
| 46.  | Statistische Ergebnisse                 | 46  |
| 47.  | Statistische Ergebnisse                 | 47  |
| 48.  | Statistische Ergebnisse                 | 48  |
| 49.  | Statistische Ergebnisse                 | 49  |
| 50.  | Statistische Ergebnisse                 | 50  |
| 51.  | Statistische Ergebnisse                 | 51  |
| 52.  | Statistische Ergebnisse                 | 52  |
| 53.  | Statistische Ergebnisse                 | 53  |
| 54.  | Statistische Ergebnisse                 | 54  |
| 55.  | Statistische Ergebnisse                 | 55  |
| 56.  | Statistische Ergebnisse                 | 56  |
| 57.  | Statistische Ergebnisse                 | 57  |
| 58.  | Statistische Ergebnisse                 | 58  |
| 59.  | Statistische Ergebnisse                 | 59  |
| 60.  | Statistische Ergebnisse                 | 60  |
| 61.  | Statistische Ergebnisse                 | 61  |
| 62.  | Statistische Ergebnisse                 | 62  |
| 63.  | Statistische Ergebnisse                 | 63  |
| 64.  | Statistische Ergebnisse                 | 64  |
| 65.  | Statistische Ergebnisse                 | 65  |
| 66.  | Statistische Ergebnisse                 | 66  |
| 67.  | Statistische Ergebnisse                 | 67  |
| 68.  | Statistische Ergebnisse                 | 68  |
| 69.  | Statistische Ergebnisse                 | 69  |
| 70.  | Statistische Ergebnisse                 | 70  |
| 71.  | Statistische Ergebnisse                 | 71  |
| 72.  | Statistische Ergebnisse                 | 72  |
| 73.  | Statistische Ergebnisse                 | 73  |
| 74.  | Statistische Ergebnisse                 | 74  |
| 75.  | Statistische Ergebnisse                 | 75  |
| 76.  | Statistische Ergebnisse                 | 76  |
| 77.  | Statistische Ergebnisse                 | 77  |
| 78.  | Statistische Ergebnisse                 | 78  |
| 79.  | Statistische Ergebnisse                 | 79  |
| 80.  | Statistische Ergebnisse                 | 80  |
| 81.  | Statistische Ergebnisse                 | 81  |
| 82.  | Statistische Ergebnisse                 | 82  |
| 83.  | Statistische Ergebnisse                 | 83  |
| 84.  | Statistische Ergebnisse                 | 84  |
| 85.  | Statistische Ergebnisse                 | 85  |
| 86.  | Statistische Ergebnisse                 | 86  |
| 87.  | Statistische Ergebnisse                 | 87  |
| 88.  | Statistische Ergebnisse                 | 88  |
| 89.  | Statistische Ergebnisse                 | 89  |
| 90.  | Statistische Ergebnisse                 | 90  |
| 91.  | Statistische Ergebnisse                 | 91  |
| 92.  | Statistische Ergebnisse                 | 92  |
| 93.  | Statistische Ergebnisse                 | 93  |
| 94.  | Statistische Ergebnisse                 | 94  |
| 95.  | Statistische Ergebnisse                 | 95  |
| 96.  | Statistische Ergebnisse                 | 96  |
| 97.  | Statistische Ergebnisse                 | 97  |
| 98.  | Statistische Ergebnisse                 | 98  |
| 99.  | Statistische Ergebnisse                 | 99  |
| 100. | Statistische Ergebnisse                 | 100 |



INHALTSVERZEICHNIS

|          |                                                                     |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1.       | Grundlagen                                                          | 6  |
| 1.1.     | Chemotherapie                                                       | 6  |
| 1.2.     | Zellkinetik normaler und maligner Gewebe                            | 6  |
| 1.3.     | Spezifische Wirkungen von Zytostatika                               | 10 |
| 1.4.     | Untersuchungen zur Steuerung der Proliferations-<br>kinetik         | 13 |
| 1.5.     | Hydroxyurea                                                         | 16 |
| 1.5.1.   | Pharmakologie                                                       | 16 |
| 1.5.2.   | Wirkung auf den Zellzyklus                                          | 19 |
| 2.       | Problemstellung                                                     | 21 |
| 3.       | Material und Methoden                                               | 22 |
| 3.1.     | Konzentration von Hydroxyurea in Blut und<br>Knochenmark            | 22 |
| 3.1.1.   | Material                                                            | 22 |
| 3.1.2.   | Methode                                                             | 23 |
| 3.2.     | Knochenmarkgewinnung                                                | 25 |
| 3.2.1.   | Material                                                            | 25 |
| 3.2.2.   | Methode                                                             | 25 |
| 3.3.     | 3H - Thymidin - Einbau in die DNS: Liquid-<br>szintillationszählung | 26 |
| 3.3.1.   | Methode A (gewaschene und in Medium resuspendierte<br>Zellen)       | 26 |
| 3.3.1.1. | Material                                                            | 26 |
| 3.3.1.2. | Methode                                                             | 27 |
| 3.3.2.   | Methode B (Zellen in autologem Serum)                               | 29 |
| 3.3.2.1. | Material                                                            | 29 |
| 3.3.2.2. | Methode                                                             | 30 |
| 3.4.     | 3H - Thymidin - Markierungsindex: Autoradiographie                  | 31 |
| 3.4.1.   | Material                                                            | 31 |
| 3.4.2.   | Methode                                                             | 32 |
| 3.5.     | DNS - Verteilungsmuster: Durchflußzytophotometrie                   | 34 |
| 3.5.1.   | Material                                                            | 34 |

|        |                                                              |    |
|--------|--------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.2. | Methode                                                      | 34 |
| 3.6.   | Morphologische Knochenmarkdifferenzierung                    | 36 |
| 3.6.1. | Ausstriche und Färbung                                       | 36 |
| 3.6.2. | Bestimmung der Myelopoeseverteilung                          | 36 |
| 3.6.3. | M / E - Quotient                                             | 37 |
| 3.7.   | Wachstum granulopoetisch determinierter Stammzellen: CFU - C | 37 |
| 3.7.1. | Material                                                     | 37 |
| 3.7.2. | Methode                                                      | 38 |
| 3.8.   | Überwachung des peripheren Blutbildes                        | 39 |
| 3.9.   | Leberenzyme und Halbwertszeit von Hydroxyurea                | 39 |
| 3.10.  | Statistik                                                    | 39 |
| 4.     | Versuchsaufbau                                               | 40 |
| 4.1.   | Hydroxyurea - Infusion                                       | 40 |
| 4.2.   | Bestimmung der Hydroxyurea - Halbwertszeit                   | 41 |
| 4.3.   | Bestimmung der Hydroxyurea - Einwirkdauer                    | 41 |
| 4.4.   | Zeitliche Folge der Knochenmarkpunktionen                    | 43 |
| 4.5.   | Verteilung des Probenmaterials                               | 43 |
| 4.6.   | Versuchsprotokoll                                            | 44 |
| 5.     | Ergebnisse                                                   | 45 |
| 5.1.   | Konzentrationen von Hydroxyurea in Blut und Knochenmark      | 45 |
| 5.2.   | Halbwertszeit und Wirkungsdauer von Hydroxyurea              | 45 |
| 5.3.   | Leberenzyme und Hydroxyurea - Halbwertszeit                  | 46 |
| 5.4.   | 3H - Thymidin - Einbauraten in die DNS                       | 47 |
| 5.4.1. | Bestimmung mit Methode A                                     | 47 |
| 5.4.2. | Bestimmung mit Methode B                                     | 49 |
| 5.5.   | 3H - Thymidin - Markierungsindex                             | 49 |
| 5.6.   | DNS - Gehalt in den Zellzyklusphasen (Verteilungsmuster)     | 55 |
| 5.7.   | Aktivitätsrate der S - Phase - Zellen                        | 57 |
| 5.8.   | Morphologische Veränderungen im Knochenmark                  | 57 |
| 5.9.   | Wachstum der granulopoetisch determinierten Stammzellen      | 63 |
| 5.10.  | Peripheres Blutbild nach Hydroxyurea - Infusion              | 63 |

|    |                 |    |
|----|-----------------|----|
| 6. | Diskussion      | 70 |
| 7. | Zusammenfassung | 96 |
| 8. | Literatur       | 97 |

## 1. GRUNDLAGEN

### 1.1. CHEMOTHERAPIE

Neben der Chirurgie und der Radiologie leistet die Innere Medizin einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung maligner Erkrankungen. Ihr Anteil besteht, abgesehen von Prophylaxe, Diagnostik und Rehabilitation vor allem in der systemischen Therapie bösartiger Geschwulste mit Chemotherapeutika. Schon 1865 wurde durch LISSAUER mit "Fowler'scher Lösung" ein Zellgift zur inneren Behandlung von Leukämien angewendet (37). Jedoch erst circa 90 Jahre später begann die Zeit der gezielten empirischen Erforschung in Form kontrollierter vergleichender Therapiestudien (37). Die Resultate dieser klinisch-empirischen Arbeiten führten zusammen mit der wachsenden Berücksichtigung neuer proliferationskinetischer und pharmakologischer Grundlagenerkenntnisse zum heutigen, verbesserten Stand der Chemotherapie maligner Tumore.

### 1.2. ZELLKINETIK NORMALER UND MALIGNER GEWEBE

Grundlegend für die Kenntnis des Wachstums normaler und maligner Zellen waren die Untersuchungen von HOWARD und PELC im Jahre 1953 (78), wonach sich der Teilungszyklus aller Zellen in mehrere Phasen, nämlich die  $G_1$ -, die S-, die  $G_2$ - und die M-Phase unterteilen läßt, in denen spezifische Stoffwechselvorgänge ablaufen. Ein weiterer Schritt war die Entwicklung des Multikompartment-Systems durch PATT und QUASTLER (76). Danach unterteilt sich ein Zellsystem in zwei Zellpools: In ruhende Q- und in proliferierende P - Zellen. Der Q - Pool besteht aus teilungsunfähigen E - Zellen und aus Zellen in Proliferationsruhe ( $G_0$ ), die aber bei Bedarf wieder in den Proliferationszyklus eintreten können. Auch Zellen mit einer sehr langen, mit den bisherigen Untersuchungsmethoden kaum erfaßbaren Teilungszeit können hier eingereiht werden (lange  $G_1$  - Phase - Zellen) (45).

Die  $G_0$ -Zellen können in einem, als "recruitment" bezeichneten Vorgang, unter bestimmten Bedingungen wieder in die  $G_1$ -Phase des Teilungszyklus eintreten. Zu den Stimuli hierfür zählen zum Beispiel eine Verbesserung der Versorgung mit Substraten oder Sauerstoff, oder die Vernichtung eines Teils der proliferierenden Zellen durch Chemo- oder Radiotherapie (45). Der umgekehrte Vorgang, also die Abwanderung vom  $G_1$ - in den  $G_0$ -Zustand ist ebenso möglich.

Im P-Kompartiment, dessen Zellen die Wachstumsfraktion (70) eines Gewebes repräsentieren, befinden sich die Zellen der Zufallsverteilung entsprechend, in den verschiedenen Zyklusphasen. Normalerweise besteht zwischen den Zellen des P- und des Q-Kompartiments ein Fließgleichgewicht (70, 89). (Abb. 1)

Bei einem sich vermehrenden, z.B. einem malignen Gewebe, hängt die Wachstumsrate von 3 Faktoren ab: Der Zellzyklusdauer, der Wachstumsfraktion und dem Zellverlust (18, 37). Die Art des Wachstums, ob exponentiell oder linear, ist unabhängig von der Zellzyklusdauer (18). Untersuchungen an menschlichen Tumoren ergaben bisher keine charakteristisch kürzere Zykluszeit, vor allem gegenüber physiologischen Wechselgeweben (45). Es zeigte sich vielmehr, daß die Generationszeit z.B. der menschlichen Knochenmark- oder Dünndarmepithelzellen kürzer ist, als die der allermeisten menschlichen Tumoren (33). Bei manchen Experimentaltumoren ist die Zellzyklusdauer allerdings extrem kurz. Wichtig für das Wachstum, gemessen an der sogenannten Verdoppelungszeit (18), ist jedoch die Größe der "growth fraction" und die Höhe der Zellverlustrate (18, 37). Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit hängen damit vor allem mit einer Verkleinerung oder Vergrößerung der Wachstumsfraktion und/oder einer Änderung des Zellverlustes zusammen (114). Jeder der genannten Wachstumsparameter unterliegt aber, insbesondere bei malignen Geweben, außerordentlich großen Schwankungen.

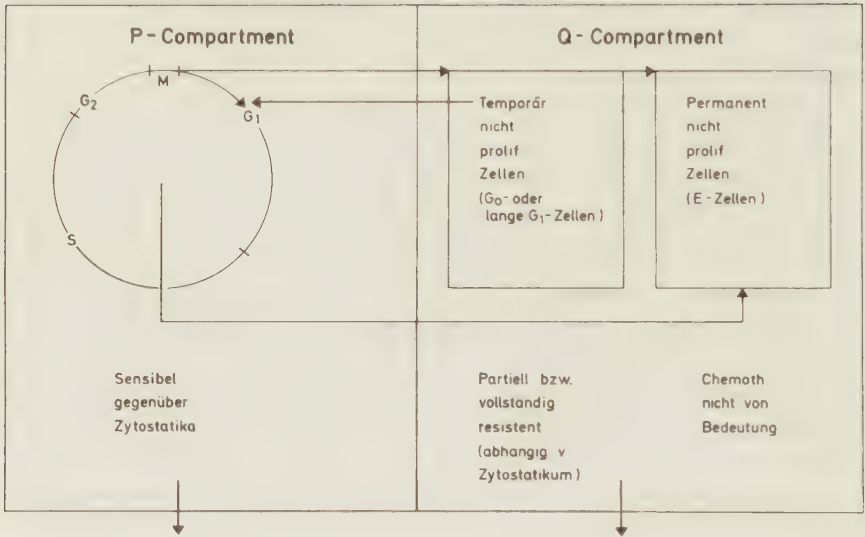


Abb. 1: Das "Multikompartiment - System" der Zellkinetik nach PATT und QUASTLER

Rationelle Versuche zur Beeinflussung der Proliferationskinetik zu therapeutischen Zwecken bedürfen daher grundlegender Untersuchungen dieser Parameter, wie sie auch in großem Umfang Gegenstand der heutigen Forschung sind. Wegen der besseren Verfügbarkeit und des oft schnelleren Wachstumsablaufs erwiesen sich experimentelle Tiertumore und Zellkulturen als sehr geeignet. Über menschliche Tumorgewebe liegen derzeit weniger, über physiologische Wechselgewebe nur wenige und über in vivo durchgeführte Untersuchungen am Menschen kaum Daten vor.

Zur Bestimmung der Zellzyklusdauer stehen vor allem autoradiographische Methoden zur Verfügung, nämlich die prozentmarkierte-Mitosen - Methode nach QUASTLER und SHERMAN (85), die Doppelmarkierung mit  $3H$  - und  $14C$  - Thymidin nach PILGRIM (81) zur S - Phasendauer - Messung, sowie die quantitative  $14C$  - Thymidin - Autoradiographie nach BRINKMANN und DÖRMER (7). Während sich für die Dauer der S -,  $G_2$  -, und M - Phase auch bei verschiedenen Autoren eine weitgehende Übereinstimmung ergibt, sowohl bei einzelnen Geweben eines Individuums, bei Geweben verschiedener Individuen, als auch bei Normal - und Tumorgeweben (Übersicht bei 103), finden sich bei den Untersuchern große Unterschiede in der Dauer der  $G_1$  - Phase. Noch mehr differieren die  $G_1$  - Phase - Zeiten zwischen verschiedenen Geweben oder Zellpopulationen. Die Unterschiede in der Generationszeit, z.B. bei Knochenmark - Zellreihen von 15 bis 200 Stunden (KLEIN und LENNARTZ, 54), entsprechen daher fast ausschließlich den Schwankungen der  $G_1$  - Phasen - Dauer.

Die Größe der Wachstumsfraktion eines Gewebes läßt sich aus dem Anteil  $3H$ -Thymidin-markierter Zellen bei Dauerinfusion mit  $3H$  - Thymidin nach MENDELSSOHN bestimmen (71). Dies ist aus ethischen Gründen beim Menschen kaum möglich. Ein Verfahren zur Berechnung liegt nur für steady-state-Wachstum vor (64). Die Wachstumsform menschlicher Metastasen erscheint jedoch als typisch exponentiell (18).

Am schwierigsten von den drei Wachstumsparametern ist die Zellverlustrate zu bestimmen (45). Sie läßt sich errechnen aus der effektiven, am Gewebe selbst gemessenen Verdoppelungszeit und der errechneten potentiellen Verdoppelungszeit (110). Dieser approximative Wert ist wenig differenziert; denn nach TUBIANA (113) kann die gleiche gemessene Verdoppelung, also das Wachstum, sowohl durch eine kleine Wachstumsrate und einen kleinen Zellverlust, als auch durch eine große Wachstumsrate mit fast entsprechend hohem Zellverlust entstehen. Ein steady state, d.h. kein Wachstum, aber mit solch hohem Umsatz, haben z.B. die physiologischen Wechselgewebe wie Knochenmark (18). SCHERTZ und MARSH (100) geben eine hohe Zellverlustrate (bis 90 %) bei langsam und bei schnell wachsenden Tumoren an. Im Endeffekt liegen über den Zellverlust kaum verlässliche Daten vor (45). Zusammenfassend muß zugestanden werden, daß die Kenntnisse der Proliferationskinetik zwar in den letzten zwanzig Jahren deutlich erweitert wurden, aber noch selten eine Übertragung experimenteller Daten auf die Klinik zulassen, welche von HILL (45) auch dementsprechend als meist spekulativ bezeichnet werden.

### 1.3. SPEZIFISCHE WIRKUNGEN VON ZYTOSTATIKA

Bis auf wenige Ausnahmen, wie Mustargen oder ionisierende Strahlung, die auch die  $G_0$  - Zellen treffen, gilt für die meisten Zytostatika die Aussage, daß sie nur auf proliferierende Zellen Wirkung ausüben, da ihre chemischen Angriffspunkte vorwiegend molekulare Prozesse betreffen, wie die Protein- und DNS - Synthese, die für bestimmte Phasen des Zyklus sich teilender Zellen charakteristisch sind (127). Nach ihrer Wirkung lassen sich zwei Hauptgruppen unterscheiden: Einerseits die zyklusabhängigen, aber phasenunspezifischen Substanzen mit Wirkung auf fast alle Zyklusphasen, wie Cyclophosphamid, 5 - Fluor - Uracil, Adriamycin und DTIC, sowie andererseits die zyklusabhängigen, phasenspezifischen Stoffe mit vorwiegender Wirkung auf eine bestimmte Zyklusphase, wie Vincristin (Mitose), Bleomycin ( $G_2$ ), Hydroxyurea (S), Cytosin-Arabinosid (S). (Übersicht bei 44). (Abb. 2).

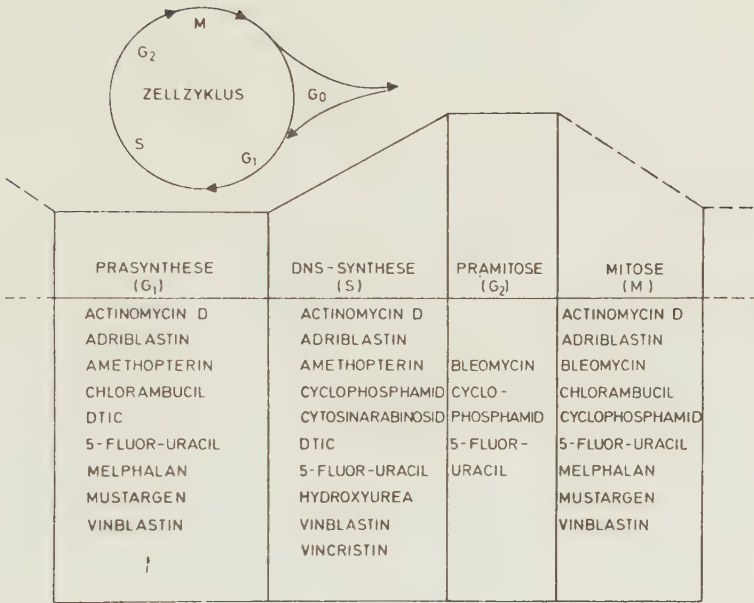


Abb. 2: Phasenspezifische Wirkung verschiedener Zytostatika

Die Phasenspezifität der letztgenannten und weiterer Substanzen ist aber dosisabhängig. Pharmaka, die wie beschrieben, sonst nur in einer definierten Phase wirksam sind, schädigen bei entsprechend höherer Dosierung Zellen in mehrerer Zyklusphasen (36). Dabei nekrotisieren die Zellen entweder sofort oder sie überleben - eventuell unter dem Einsatz von "repair" - Vorgängen - zunächst, proliferieren meist jedoch langsamer und sterben in einer der nachfolgenden Zyklusphasen oder Zyklen ab. Ursache dieses späteren Zelltodes ist das sogenannte "unbalanced growth": d.h. daß viele Synthese- und Stoffwechselleistungen in der Zelle weiterlaufen, während ein essentieller biochemischer Vorgang blockiert, bzw. ganz aufgehoben wurde (74). Von großer Bedeutung für das unausgeglichene Wachstum ist auch die Einwirkdauer des Medikaments. Allgemein kann gesagt werden, daß der Grad der Letalität entweder der Höhe der Dosierung oder der Länge der Einwirkdauer - oder beidem - proportional entspricht. Die Kurve Dosis/letale Wirkung scheint nicht immer linear zu verlaufen, wie HARTENSTEIN und Mitarbeiter (42) bei Versuchen mit Hydroxyurea am Knochenmark von Ratten zeigten.

Neben der Zellzyklusphasenspezifität der Einzelsubstanzen besteht ferner eine gewisse Tumorspezifität, d.h. manche Tumore erweisen sich einem Zytostatikum gegenüber als primär resistent, bzw. sprechen im Sinne einer sich während der Therapie sekundär entwickelnden Sensibilitätserniedrigung nicht mehr an. Dieser Tatsache kann bereits in Form einer *in vitro*-Resistenz-Testung von Tumorgewebe gegen verschiedene Substanzen bei der Fragestellung der Ansprechbarkeit auf ein Zytostatikum Rechnung getragen werden (84).

Eine weitere, relative Spezifität von Zytostatika besteht gegenüber Normalgeweben, wie Knochenmark, Darmepithelien, Haarwurzeln, aber auch Nervengewebe, wie aus der Klinik bekannt ist. (Übersicht bei 28). Diese unerwünschten, toxischen Wirkungen sind ebenfalls dosisabhängig, z.T. von der Einzel-, z.T. von der Gesamtdosis und limitieren den Einsatz im klinisch therapeutischen Bereich. Die Berücksichtigung dieser 3 Arten von relativer Spezifität führte weg von der Monotherapie zur zytostatischen Kombinationstherapie.

Diese Therapie - Schemata sind noch weitgehend empirisch erarbeitet. Die proliferationskinetischen Grundlagen, sowie die Kenntnisse über die Pharmakokinetik der Medikamente sind bruchstückhaft, so daß eine rationale Planung sehr schwierig ist und noch häufig eine hohe Toxizität resultiert (36).

#### 1.4. UNTERSUCHUNGEN ZUR STEUERUNG DER PROLIFERATIONSKINETIK

Dem Ziel einer Verbesserung der Chemotherapie unter größtmöglicher Schonung der Normalgewebe versprach das Konzept der sogenannten Synchronisationstherapie, vor ca. einem Jahrzehnt aus den Kenntnissen der Proliferationskinetik und der Phasenspezifität der Zytostatika theoretisch entwickelt, näherzukommen. Basis hierzu waren Untersuchungen, in denen sich bei der Anwendung einiger phasenspezifischer Zytostatika eine dosisabhängige, temporäre und reversible Inhibition des Zellzyklus ergaben.

Das Prinzip der Synchronisation proliferierender Zellen beruht auf der Vorstellung, die sich asynchron teilenden Zellen normaler und maligner Gewebe durch eine geeignete Substanz an einer Stelle des Zyklus temporär zu blockieren, die sich vorher in anderen Phasen befindlichen Zellen in diesem Block auflaufen zu lassen, um sie dann, nach Aufhebung des Blocks synchron durch die nächsten Phasen oder gar Zyklen weiterlaufen zu lassen. Synchronisation als solche kann in vitro in einem hohen Maß durch Methoden wie Kälteschock, Thymidinüberschuß, isolieren von Mitosezellen und Isoleucin-Entzug (115) oder Hell-Dunkel-Wechsel (120) erreicht werden (75).

Für die Konzeption der Synchronisationstherapie von wichtigster Bedeutung ist der oben beschriebene Vorgang des Phasen-Blocks durch ein "zytostatisches", d.h. nicht toxisches Medikament. Es sollte sich nach Ende des Blocks ein möglichst hoher Anteil der Zellpopulation in einer definierten Phase befinden, damit der Einsatz einer hier hochspezifischen zytotoxischen Substanz ein Maximum an empfindlichen Zellen trifft und so ein, über das Maß der zufälligen Applikation hinaus gesteigerter Tumorzell-Untergang erreicht werden kann.

Weiterhin muß aber gefordert werden, daß unterschiedliche Zyklusphasezeiten zwischen Tumor und Normalgewebe bestehen, damit eine Schädigung der mitsynchronisierten Normalgewebe im zweiten, zytotoxischen Schritt durch entsprechende "Zyklusphasenverschiebung" möglichst vermieden wird (38).

Anfang der siebziger Jahre begann eine Reihe von Untersuchungen zur Entwicklung von Synchronisationstherapie - Modellen an experimentellen Tiertumoren, an menschlichen Hämoblastosen und soliden Tumoren, sowie Vergleichsuntersuchungen an tierischen Normalgeweben, vor allem Knochenmark. (Übersicht bei 38 u. 115). Die dabei hauptsächlich verwendeten Methoden, die Verteilung der Zellen in den Phasen zu erfassen, sind der Mitose - Index, definiert als die Zahl der Mitosen pro 100 Zellen und der 3H - Thymidin - Markierungsindex, definiert als Prozentsatz der DNS - synthetisierenden Zellen innerhalb eines bestimmten Zeitraums (120). Dazu kam die Methode der Durchflußzytophotometrie, mit der sich die momentanen DNS - Gehalte der Zellen darstellen lassen (120).

Die Mitte und Ende der siebziger Jahre durchgeführten Versuche ergaben neben einigen ansprechenden Ergebnissen bei Therapie - studien - z.B. bei der akuten Leukämie des Menschen (61, 62, 99, 126) - nur bei schnell proliferierenden experimentellen Tiertumoren und tierischen Normalgeweben positive Ergebnisse (38, 78, 88, 90, 91, 114, 120). Viele Untersuchungen zeigten aber widersprüchliche oder negative Ergebnisse (38, 49, 50), sowie Resultate, deren Aussagen nicht immer mit Synchronisationseffekten zu erklären sind (36, 52, 53, 54).

In einer kritischen Übersichtsarbeit wies VAN PUTTEN 1976 (115) darauf hin, daß bisher beim Menschen keinerlei ausreichende Methoden vorliegen, eine für die therapeutisch - effektive Nutzung notwendige differenzierte Synchronisation von Tumorzellen einerseits und Normalzellen andererseits zu erzielen. Die Mehrzahl der klinischen Erfolge kann nicht auf die dabei angewendeten Methoden zur Zellsynchronisation zurückgeführt werden.

Aus all diesen Untersuchungen können insgesamt einige deutliche, die Indikation realistisch einschätzende Aussagen getroffen werden. Ein höherer Grad an Synchronisation ist in vivo nur zu erreichen, wenn die behandelte Tumorzellpopulation eine große Wachstumsfraktion aufweist, eine möglichst große Homogenität der Zellen hinsichtlich der Zyklusparameter und eine kurze Generationszeit vorliegt und die Zellzyklusparameter der Tumorzellen im Hinblick auf eine Schonung möglichst verschieden von denen der Normalgewebe sind. Desgleichen liegen Anforderungen an die synchronisierende Substanz vor, die einen phasenspezifischen reversiblen Block erzeugen soll, in dieser Zeit weder für den Tumor noch für Normalgewebe toxisch sein soll und durch eine kurze Halbwertszeit eine prompte Aufhebung der Wachstumsblockade garantieren soll, d.h. pharmakologisch gut steuerbar sein soll (38, 41, 115).

Grundsätzlich zeigte sich bei fast allen darüber berichtenden Arbeiten, daß bei menschlichen Tumoren nach einer jeweils meßbaren Anhäufung der teilsynchron proliferierenden Zellen in einer bestimmten Phase sehr schnell eine Desynchronisation, also eine Rückkehr zum vorherigen Zustand der zufälligen Verteilung erfolgte (18, 75). Als Ursache werden unterschiedliche Zellzykluszeiten der einzelnen Zellen innerhalb des gleichen Gewebes angegeben (126). Die Variationsbreite der Zellzyklusdauer ist bei menschlichen Tumoren, vor allem solchen mit langer Generationszeit wesentlich größer als bei Experimentaltumoren (114).

Folgende Substanzen können aufgrund ihrer Eigenschaften als potentiell geeignet für die Steuerung des Zellzyklus proliferierender Zellen bezeichnet werden: Hydroxyurea, 5 - Fluoro - Uracil, Cytosin - Arabinosid und Vincristin.

Obwohl mit Vincristin die Phase der klinischen Anwendung des Konzepts der Synchronisationstherapie begann (55), zeigte sich, daß die beschriebenen Erfolge weniger im Sinne einer beabsichtigten, definitionsgemäßen Synchronisation, als vielmehr als sequentielle Kombinationschemotherapie interpretiert werden müssen (38, 115, 121).

Zwar fand sich eine Arretierung und sehr deutliche Akkumulation von Tumorzellen in der Mitosenphase, jedoch konnte keine nachfolgende synchrone Passage bewiesen werden (39). Als Ursache müssen neben der toxischen Schädigung der Zellen vor alle die eventuell daraus resultierende lange Auslaufzeit der Zellen aus dem Mitoseblock angenommen werden, welche ja den Grundbedingungen der Synchronisation widerspricht (38, 99).

Der gleiche Vorgang scheint nach CAMPLEJOHN (10) für 5 - Fluoro - Uracil zuzutreffen, obwohl über gute klinische Resultate bei einer Behandlung mit dieser Substanz mit anschließender Radiotherapie berichtet wird (124).

Über Cytosin - Arabinosid liegen nur wenige Untersuchungen vor, wobei GIBSON (34) bei einem B16 - Melanom über eine erfolgreiche Wachstumsblockade in der S - Phase mit anschließendem synchronen Weiterlaufen der Zellen berichtet.

Dagegen gibt es eine Vielzahl von Arbeiten, sowohl proliferationskinetischen Studien (42, 68, 78, 91, 106, 107, 130, 131) als auch klinisch-therapeutischen Untersuchungen (99, 126) mit Hydroxyurea als Synchronisationssubstanz.

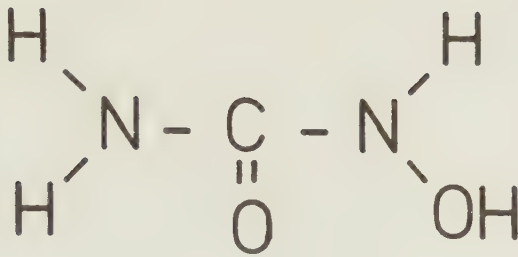
## 1.5. HYDROXYUREA

### 1.5.1. PHARMAKOLOGIE

Hydroxyurea wurde 1869 erstmalig von DRESLER und STEIN (22) synthetisiert. (Abb. 3)

Über seine Wirkung als spezifischer Hemmstoff der DNS - Synthese wurde erst 1964 durch YOUNG (130) berichtet. Sein Einsatz als Zytostatikum, vor allem als Mono- Substanz war aber gering, über Erfolge bei strenger Indikationsstellung bei Leukämien wird berichtet (104).

Hydroxyurea inhibiert vor allem die DNS - Synthese des Zellkerns, während die Synthese von DNS im Zytoplasma weniger spezifisch gehemmt wird (117). Die RNS- und die Protein - Synthese werden von HU kaum beeinflusst (83, 107, 129, 130, 131). Eine andere, bekannte Wirkung besteht in der Hemmung der Histon - Synthese,



Hydroxyurea – Molekül

Molekulargewicht 76,1

Abb. 3: Chemische Strukturformel von Hydroxyurea

gezeigt an HeLa-Zellen (9). Da die DNS - Synthese nur in der S - Phase des Zellzyklus stattfindet, ist die Wirkung von HU als S - Phasenspezifische zu bezeichnen (51, 80, 107, 122, 129). Dabei sind die molekularen Wirkungsmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt. Von FRENKEL ET AL. (31) wird über die Hemmung der Reduktion von Cytidindiphosphat zu Desoxycytidindiphosphat berichtet, ebenso von ADAMS und LINDSAY (1), also über einen Eingriff in den Pyrimidinnucleotid-Stoffwechsel bei der DNS - Synthese. Aus der Hemmung des Enzyms B 2 des Ribonucleotid - Reduktase - Systems resultiert damit eine Blockade der Umwandlung von Ribonucleotiden in Desoxyribonucleotide (56, 130). Dieser Befund wurde durch YOUNG ET AL. (131) erhärtet, der eine teilweise Aufhebung der durch HU induzierten Synthesehemmung in HeLa-Zellen durch die Zugabe von Desoxyribonucleotiden erreichte, während YARBRO (129) genau diesen Vorgang nicht bestätigen konnte und daher weitere Wirkungen von HU auf die DNS - Synthese annahm. Nach Untersuchungen von WALKER ET AL. (122) fanden sich durch HU ausgelöste Brüche von DNS - Strängen in S - Phase - Zellen, die aber durch die Zugabe von Desoxyribonucleotiden verhindert werden konnten, so daß als mögliche Wirkung ebenfalls eine Verminderung des Desoxyribonucleotidpools angenommen werden mußte (82, 122). In Versuchen mit hohen HU - Dosen an Mäusen beschreiben HERKEN ET AL. (43) bereits nach 2 Stunden elektronenmikroskopisch sichtbare Verdichtungen der Chromatinstruktur, denen eine Stunde später die totale Nekrose der sich in der S - Phase befindenden Zellen folgte. Dies spricht für eine bisher nicht erklärbare, eventuell direkte Wirkung auf die DNS (siehe auch 51).

Weiterhin liegen Arbeiten vor, in denen doch von einer Beeinflussung der RNS - Synthese nach HU - Applikation gesprochen wird (58). Dies könnte jedoch auf den Einfluß von Isohydroxyharnstoff zurückzuführen sein, das unter in - vivo - Bedingungen unter Umständen als aktiver Metabolit aus HU entstehen kann (96) und vornehmlich die RNS -, Synthese blockiert. ROSENKRANZ ET AL. (95) konnten neben Isohydroxyharnstoff auch N,O - Dicarbamoylhydroxylamin und eine weitere Nitrosoharnstoffverbindung in gealterten HU - Lösungen finden, die auch als mögliche Metabolite in Frage kommen.

N,O - DCAH, das in Bakterien mehr die RNS- und Protein - Synthese hemmt (95) zeigte in vergleichenden Untersuchungen an menschlichen Lymphoblastenkulturen den gleichen DNS - Hemmeffekt wie HU (77). Außerdem entsteht Hydroxylamin auch in vivo aus HU, greift dann in die Proteinsynthese ein und führt in vitro zu DNS - Strang - Brüchen (130).

Ein weiterer Effekt von HU scheint die Blockierung der Pyrimidinsynthese vor der Bildung der Orotsäure zu sein (119). Nach neuerster Literatur hemmt HU die Induktion des Enzyms Ornithindecarboxylase (ODC), das in schnell wachsenden Geweben große Aktivität zeigt und wahrscheinlich zum Ablauf der DNS - Synthese notwendig ist (13, 111).

Nach ADAMSON ET AL. (2) wird HU in der Leber größtenteils zu Harnstoff umgewandelt, vorwiegend durch enzymatische Reduktion (11), sowie anschließend in dieser Form, aber auch unverändert (26), über die Nieren ausgeschieden. Die Halbwertszeit ist somit von der enzymatischen Funktion der Leber abhängig und zeigt innerhalb einer Säugetierspezies charakteristische Werte (91). Die enterale Resorption und Gewebeverteilung erfolgt schnell. Bereits 1 Stunde nach einmaliger peroraler Gabe wird die maximale Blutkonzentration beim Menschen erreicht (40, 99). Darauf erfolgt ein rascher, exponentieller Abfall (99). ABES ET AL. (87) zeigten an Ratten, daß sich in HU - katabolisierenden Leberzellen eine wesentlich kürzere HU - Halbwertszeit als in nicht - parenchymatösen Leberzellen findet.

#### 1.5.2. WIRKUNG AUF DEN ZELLYKLUS

Die DNS - Synthese - hemmende Wirkung von HU ist dosisabhängig und reversibel, so daß eine temporäre Inhibition des Zellzyklus möglich ist (51, 88, 90, 91, 107). Als Zeitpunkt einer Blockade im Zyklusablauf gibt erstmals SINCLAIR 1965 (106) den Übergang von der  $G_1$ - in die S - Phase an. Dieser Auffassung des HU - Blocks bei  $G_1/S$ , bzw. in der früheren S - Phase schlossen sich viele Autoren nach Arbeiten mit Experimental-, Normal- und Tumorgewebe bei Tieren und seltener auch bei Menschen an (38, 42, 68, 77, 87, 91, 99, 121, 126).

Allerdings konnten andere Autoren nachweisen, daß die DNS - Syntheserate durch HU zwar erheblich vermindert, jedoch nicht total unterdrückt wird (30, 123). Dies wurde von CRESS und WERNER (13) bestätigt, die feststellten, daß die mit HU behandelten Zellen in die S - Phase einlaufen können und die DNS - Synthese beginnen, diese dann aber nach kurzer Zeit nicht mehr weiter führen. Auch VOGEL (118) zeigte, daß die inhibierte Zellpopulation mit HU als Zytostatikum relativ unhomogen ist und die Zellen nach Aufhebung der Medikamentenwirkung nicht alle von einem identischen "arresting point" aus starten.

Abhängig von einer hohen Dosis und einer langen Wirkungsdauer entfaltet HU eine cytotoxische Wirkung, aber nur auf S- Phase - Zellen (51, 80, 91, 106, 122). Bei sehr hoher Dosis kommt es innerhalb weniger Stunden, vermutlich durch direkte Angriffe auf die DNS - Doppelstränge, zum Zelltod (51, 122).

Ein Mechanismus, der die Zeitabhängigkeit der Toxizität erklärt, ist in der Ausbildung eines "unbalanced growth" zu finden (74). Die Hemmung der DNS - Synthese und das Weiterlaufen, bzw. die geringere Hemmung der RNS- und Proteinsynthese führen zu diesem unausgeglichene Wachstum, woraus schließlich der Verlust der reproduktiven Kapazität der Zellen resultiert. Dieser unausgeglichene Stoffwechselzustand kann von der Zelle maximal bis zur Dauer einer Generationszeit ertragen werden, so daß die einsetzenden Repair - Mechanismen (63, 107, 122) noch erfolgreich durchgeführt werden können. Interessant ist, daß einige Autoren das "unbalanced growth" bei regenerierender Rattenleber nicht vorfanden, was auf eine besondere Unempfindlichkeit dieses Gewebes gegen HU schließen läßt (27, 87, 105). Auf eine gewebsspezifische Empfindlichkeit weisen auch KIM ET AL. (51) und SINCLAIR (107) hin, da eine für Hamsterzellen letale HU - Dosis HeLa - Zellen nicht beeinträchtigt. Besonders ausgeprägte Sensibilität fand RATTWICK bei Zellen vom lymphatischen Typ (91).

Da sowohl Zytotoxizität als auch bloße DNS - Synthese - Hemmung dosis- und zeitabhängig sind, ist es möglich, minimale Hemmkonzentrationen und ideale Einwirkdauer - wahrscheinlich Generationszeit minus S - Phase - Zeit - im Prinzip zu bestimmen (38, 78).

Das in vielen Geweben nach Verabreichung von Hydroxyurea gefundene teilsynchrone Durchlaufen der nächsten Zellzyklusphasen, gemessen meist am  $3H$  - Thymidin - Markierungsindeks (38, 72, 77, 121), sowie die teilweise geringe Zytotoxizität (38, 72) lassen HU als die bisher praktikabelste Substanz zur Beeinflussung proliferierender Gewebe erscheinen (91). Eine zusätzliche Beteiligung von aus dem ruhenden Zellkompartiment rekrutierten Zellen am "Partialsynchronisationseffekt" und eine eventuell toxische Schädigung als Auslöser des "recruitment" ist aber sehr wahrscheinlich (40, 114). Grundsätzlich könnten die das theoretische Konzept der Zellsynchronisation noch am ehesten stützenden Ergebnisse an schnellproliferierenden Tiertumoren durch Verwendung von Hydroxyurea erreicht werden (120).

## 2. PROBLEMSTELLUNG

Ausgehend vom vorher beschriebenen Wissensstand und unter Berücksichtigung der gegebenen technischen Möglichkeiten stellt sich die Grundfrage:

Ist eine Beeinflussung oder gar Steuerung des Wachstumsverhaltens proliferierender Normalgewebe, speziell des Knochenmarks des Menschen, in vivo durch Hydroxyurea möglich? Ist die dafür unabdingbare Nicht - Toxizität beweisbar?

Dazu sind folgende Problempunkte zu klären:

Die Frage der Wirkung einer definierten Blutkonzentration von HU über einen definierten Zeitraum auf die DNS - Synthese proliferierender Knochenmarkszellen, durch Bestimmung der  $3H$  - Thymidin - Einbauraten in die DNS und durch Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflußzytometrie;

die Frage des Verhaltens der DNS - Synthese der Zellen nach Beendigung der HU - Wirkung, durch die vorgenannten Methoden;

die Frage der Toxizität von HU auf das blutbildende System, durch Untersuchung des Wachstums von granulopoetisch determinierten Stammzellen (CFUc), durch Bestimmung der M/E - Quotienten anhand von Differentialausstrichen und durch Beobachtung

des peripheren Blutbilds über längere Zeit;

die Frage der pharmakokinetischen Steuerbarkeit von HU bei peroraler Dauerinfusion, durch Messung der Blut- und Knochenmarkkonzentrationen und durch Bestimmung der Halbwertszeit in vivo;

die Frage der Relevanz der Untersuchungsergebnisse für die Chemotherapie maligner Tumore unter größtmöglicher Schonung physiologischer Wechselgewebe;

die Frage der Durchführbarkeit verschiedener Labormethoden zur Untersuchung proliferationskinetischer Parameter.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. KONZENTRATION VON HYDROXYUREA IN BLUT UND KNOCHENMARK

##### 3.1.1. Material

- Hydroxyurea, reinst (Fa. Serva, Heidelberg)
- Hydroxyurea - Stammlösung: 8 mg HU in 2 ml  $H_2O$  bidest., bei -18 Grad C aufbewahren, lichtgeschützt
- Filter Selecta Nr. 595 1/2
- PCA 1 M
- PCA 0,5 M
- Puffer, pH 7,5 : 50 ml  $Na_2HPO_4$  und 9 ml  $NaH_2PO_4$  1,5 M in 43 ml  $H_2O$  bidest., durch weitere Zugabe von Säure oder Lauge am pH - Meter ausgleichen
- NaOH 8,5 N
- NaOH 6 N
- Sulfanilsäure 1 % (2 - 3 Monate haltbar)
- Jodlösung 0,1 N in Kaliumjodid 2,5 %
- Natriumthiosulfat - Lösung 0,1 M : 1,24 g auf 50 ml  $H_2O$  bidest. jeweils frisch ansetzen, nur 24 Stunden haltbar
- N - alpha - Naphtyläthylendiamin - dihydrochlorid (N - alpha - NED - Lösung) : 50 mg N - alpha - NED in 8,75 ml 12 N HCL und 50 ml  $H_2O$  bidest. im Eisbad, jeweils frisch ansetzen, nur 24 Stunden haltbar

### 3.1.2. Methode

Das Prinzip entspricht der Methode zur Bestimmung von Hydroxamaten, die speziell für HU modifiziert wurde (26). Danach entsteht bei der Jodoxidation von HU Nitrit, das Sulfanilsäure diazotiert. Nach Reduktion des, durch seine Farbe störenden überschüssigen Jods mit Natriumthiosulfat und Zugabe von N - alpha - NED zu der dann farblosen Lösung, ergibt dies mit der diazotierten Sulfanilsäure einen roten Farbkomplex, der im Photometer bei 540 nm meßbar ist.

Aufbereitung: 0,5 ml Blut, bzw. KM-Punktat werden mit 4,5 ml Aqua bidest. gemischt, nach 1 Minute und erfolgter Hämolyse werden 5 ml PCA 1 M dazugegeben, womit die Zellen denaturiert werden. Nach 10 Minuten erfolgt Zentrifugation für 20 Minuten bei 3000 U/min bei 4 Grad C. Der Überstand wird durch ein Faltenfilter filtriert, das vorher mit 0,5 M PCA angefeuchtet worden ist. Das Filtrat wird sofort weiterverarbeitet oder bei - 18 Grad C aufbewahrt.

Analyse: Dazu werden je 2 ml der Filtrate oder der Standardverdünnungslösungen mit 1 ml Pufferlösung (pH 7,5), sowie mit 0,1 ml NaOH 6 N und 0,05 ml NaOH 8,5 N hinzupipettiert und gemischt. Dann kommt 1 ml Sulfanilsäure 1 % dazu. Nach dem Mischen soll der pH - Wert zwischen 6,9 und 7,3 liegen; falls nicht, wird mit NaOH 8,5 N oder PCA 1 M korrigiert. Anschließend mischt man 0,1 ml Na - Thiosulfat - Lösung zu. Danach erfolgt sofort die Zugabe von 1 ml eisgekühltem N - alpha - NED - Reagenz. Dann wird gemischt und nach 20 Minuten die Farbentwicklung bei 540 nm am Photometer gegen den Leerwert abgelesen. Grundsätzlich erfolgen für jeden Wert Doppelansätze und Doppelbestimmungen. Der Leerwert enthält 2 ml Filtrat von Blut, das kurz vor der Gabe von HU abgenommen wurde, bzw. entspricht dem Ansatz 1 der Standardverdünnungsreihe.

Auswertung: Die abgelesenen Extinktionswerte werden auf eine Standardkurve zur HU - Bestimmung übertragen, aus der dann,

nach Multiplikation mit dem Faktor 20 die Blutkonzentration entnommen werden können.

Die Standardkurve (Eichkurve) für die Konzentrationsbestimmung von HU wurde unter Verwendung einer Verdünnungsreihe der HU - Stammlösung (8 mg HU / 1 H<sub>2</sub>O bidest.) bei jedem Versuch neu erstellt (Abb. 4).

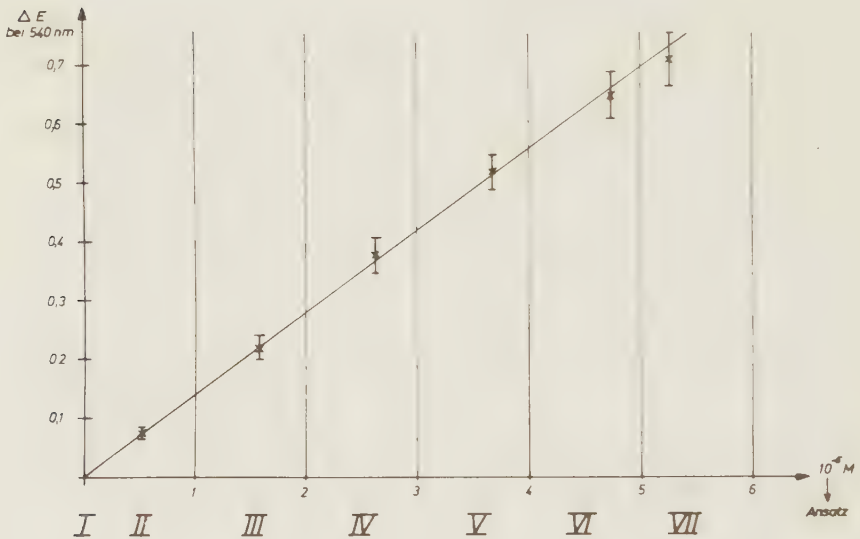


Abb. 4: Standardkurve zur Hydroxyurea - Konzentrationsbestimmung

Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 20

Römische Ziffer: Ansatz - Nummer

ΔE: Extinktion minus Leerwert

Verdünnungsreihe der HU - Stammlösung ( $1,05 \times 10^{-4} \text{ M}$ ):

| Ansatz | ml der Stammlsg. | ml $\text{H}_2\text{O}$ bid. | ml PCA 1 M | Konz. HU                   |
|--------|------------------|------------------------------|------------|----------------------------|
| I      | 0                | 1,0                          | 1,0        | 0,0                        |
| II     | 0,1              | 0,9                          | 1,0        | 0,525                      |
| III    | 0,3              | 0,7                          | 1,0        | 1,575                      |
| IV     | 0,5              | 0,5                          | 1,0        | 2,625                      |
| V      | 0,7              | 0,3                          | 1,0        | 3,675                      |
| VI     | 0,9              | 0,1                          | 1,0        | 4,725                      |
| VII    | 1,0              | 0                            | 1,0        | 5,250                      |
|        |                  |                              |            | $\times 10^{-4} \text{ M}$ |

### 3.2. KNOCHENMARKGEWINNUNG

#### 3.2.1. Material

- Punktionsnadel nach KLIMA und ROSEGGGER (23)
- sterile Glasspritze 20 ml
- sterile Einmalspritze 5 ml mit Kanüle Nr. 12
- Lokalanästhetikum (z.B. Scandicain) 1 % zur Infiltrationsanästhesie, 5 - 10 ml
- Tupfer, Desinfektionsmittel (z.B. Kodan), Verbandmaterial
- Reagenzgläser, Objektträger

#### 3.2.2. Methode

Die Knochenmarkpunktionen wurden mit der Punktionsnadel nach KLIMA und ROSEGGGER vorgenommen. Punktionsstellen waren das Sternum zwischen 2. und 3. Rippe und die Spinae iliacae posteriores des Beckenkamms (23). Dabei wurden nach Hautdesin-

fektion, Lokalanästhesie und Punktion ca. 3 ml Knochenmark durch einmaligen Zug an der 20 ml - Glasspritze gewonnen. Das Punktat wurde dann sofort in die vorbereiteten Reagenzgläser, bzw. auf eine Uhrglasschale und fettfreie, saubere Objektträger gebracht. Die Punktionsstelle wurde steril verbunden und mit einem kleinen Sandsack komprimiert.

### 3.3. 3H - THYMIDIN - EINBAU IN DIE DNS: LIQUIDSZINTILLATIONSZÄHLUNG

#### 3.3.1. Methode A (gewaschene und in Medium resuspendierte Zellen)

##### 3.3.1.1. Material

- Magnesium - Titriplex - Lösung 5 % : 5 g Mg - Titriplex (Merck 8409) ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- Ammoniumchlorid - Lösung 0,83 % : 0,83 g Ammoniumchlorid (Merck 1145) ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- 1/15 M Puffer nach SÖRENSEN, pH 7,4 : 80,8 ml 1/15 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck 5101) (1,16 g ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest) und 19,2 ml 1/15 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 4873) (0,91 g ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest. mischen)
- Ringer - Phosphat - Glukose - Lösung (RPG - Lösung)
- Ringerlösung (1 Monat haltbar)  
3,1 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,05 g MgCl<sub>2</sub>, 1 g NaHCO<sub>3</sub> (alle Merck) ad 500 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- Ringer - Phosphat - Glukose - Lösung (frisch ansetzen)  
50 mg Glukose (Merck 8342), 22,5 ml Ringerlösung und 2,5 ml Sörensen - Puffer
- TC Minimal Medium, Eagle Spinner Modified (Difco 5838-72, 100 ml)
- TC Horse Serum desicc. (Difco 5357-57, 5 ml), in 1 ml - Portionen einfrieren, aufgetautes Serum 1 Woche haltbar
- TC Glutamin 5 % (Difco 5789-59, 10 ml), 50 mg in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. in Wärme lösen, immer frisch ansetzen

- Mediumgemisch: 9,5 ml TC Minimal Medium und 0,5 ml TC Horse Serum mischen, täglich frisch ansetzen
- Trichloressigsäure 5 %
- Salzsäure 0,1 N
- Szintillationslösung: 2,5 l Toluol (Merck 8325) und 10 mg Omnifluor (NEN Chemicals) mischen
- Milliporefilter HAWP 02500HA 0,45  $\mu$ , weiß, glatt
- Milliporefilteranlage XX 2702550
- Szintillationsgefäße (Polyäthylen LsC - Vials with caps, Code Nr. 5021, NEF 938, NEN Chemicals)
- Nicht - markierte Thymidin - Lösung: 2,42 mg Thymidin (Fluka 89270, 1 g) ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- Radioaktive Thymidin - Lösung: 3H - Thymidin (Buchler TRA 306) spezifische Aktivität 2 Ci/mmol, radioaktive Konzentration 5 mCi/ 5 ml
- Radioaktive Gebrauchslösung: 0,5 ml markierte 3H - TdR - Lösung und 7,5 ml nicht - markierte Thymidin - Lösung mit 2 ml H<sub>2</sub>O bidest. mischen, Portionen zu 0,05 ml in Eppendorf - Reaktionsgefäßen einfrieren
- Flüssigkeitsszintillationszähler Packard Tri Carb
- Neubauer Zählkammer

### 3.3.1.2. Methode

Bestimmung des 3H - TdR - Einbaus in KM - Zellen nach HÄMOLYSE, Waschung und Resuspension in Medium (nach WILMANNs und SAUER, (86) sowie Arbeitsanleitung):

Circa 1 ml Knochenmarkpunktat werden sofort aus der Punktions-spritze in ein eisgekühltes Plastik - Reagenzröhrchen mit 1 ml Ringer - Phosphat - Glukose - Lösung und 0,2 ml 5 % Mg - Titriplex - Lösung gespritzt und gut gemischt. Dann wird 5 Minuten bei 1000 rpm in der Kühlzentrifuge (ca. 4 Grad C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment mit 0,83 % Ammoniumchlorid - Lösung hämolysiert, je nach Erythrozyten-Verschmutzung mit 2 - 10 ml, und dieses Gemisch 3 - 5 Minuten im Eis stehengelassen.

Es erfolgt eine weitere Zentrifugation über 5 Minuten mit 1000 rpm bei 4 Grad C; der Überstand wird vorsichtig abgekippt. Sodann wird das Sediment zweimal in Ringer - Phosphat - Glukose - Lösung gewaschen und jeweils in der beschriebenen Art zentrifugiert. Am Ende suspendiert man das Sediment mit einer der Größe angepaßten Menge RPG - Lösung. Die Zellsuspension soll vor der Zählung jetzt homogen aussehen und keinesfalls mehr Klumpen enthalten. In einer Leuko - Mischpipette wird die Zellsuspension bis Marke 1, und Essigsäure (3 %) bis Marke 101 aufgezogen (Verdünnung 1:100). Dann zählt man die 4 großen Eckquadrate der Neubauer - Zählkammer in üblicher Weise aus, addiert die 4 Werte und multipliziert mit dem Faktor 50. Die gewünschte Zellzahl von  $100.000 \text{ mm}^3$  wird dann entweder durch Zugabe von RPG - Lösung, oder durch kurzes Abzentrifugieren und Resuspendieren in weniger RPG - Lösung eingestellt.

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gewünschte Menge Zellsusp.}}{\text{vorh. Menge Zellsusp.} \times \text{gezählte Zellzahl}} = 100.000 \text{ (= gewünschte Konz.)}$$

Von der Zellsuspension ( $100.000/\text{mm}^3$ ) werden 0,02 ml zum Ansatz verwendet. Bei geringen Zellzahlen wird mehr Zellsuspension zugesetzt und dafür das Volumen des Mediumgemisches reduziert.

Die Ansätze setzen sich wie folgt zusammen:

|                   | Leerwert | Hauptwert |
|-------------------|----------|-----------|
| Glutamin          | 0,05 ml  | 0,05 ml   |
| Mediumgemisch     | 0,93 ml  | 0,91 ml   |
| Zellsuspension    | 0        | 0,02 ml   |
| 3H - TdR - Lösung | 0,02 ml  | 0,02 ml   |

Die Proben werden in Eppendorf - Reaktionsgefäße pipettiert, gemischt und 2 Stunden bei 37 Grad C im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubationsende stellt man die Proben zum Abstoppen der Reaktion sofort in Eis. Für den Standard werden vor dem Auswaschen vom Leerwert 0,02 ml entnommen und auf ein Millipore - Filter pipettiert. Anschließend wird das Filter sofort getrocknet und wie die

anderen Ansätze weiterbehandelt. Die Leer- und Hauptwerte wäscht man wie folgt in der Millipore - Filteranlage: Der gesamte Ansatz eines Reaktionsgefäßes wird auf ein Filterscheibchen pipettiert und dreimal mit je 2 ml eiskalter Trichloressigsäure 5 % und danach dreimal mit je 2 ml eiskalter Salzsäure 0,1 N gewaschen. Anschließend gibt man die Millipore - Filterscheibchen in die Szintillationsgefäße, trocknet 20 Minuten bei 80 Grad C, läßt abkühlen, füllt mit 10 ml Omnifluor - Toluol - Szintillations- Lösung auf und läßt die Gefäße nochmals ca. 30 Minuten im Kühlschrank stehen. Danach werden sie in den Szintillationszähler gestellt.

Die Berechnung der Meßwerte erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{\text{CPM (Hauptwert - Leerwert)} \times 40}{\text{cpm}_{\text{Stand.}} \times \text{eingesetzte Zellen } (10^7)} = \text{nMol/2 Std/}10^{10} \text{ Zellen}$$

### 3.3.2. Methode B (Zellen in autologem Serum)

#### 3.3.2.1. Material

- steriles Glas - Reagenzglas
- steriler Glasstab
- sterile Einmalspritze 5 ml, Kanüle Nr. 12
- Trichloressigsäure 5 %
- Salzsäure 0,1 N (Merck 9060)
- Millipore - Filter, wie oben bei Methode A
- Millipore - Filteranlage XX 2702550 (Millipore Corp. Bedford, USA) wie oben
- Szintillationslösung, wie oben
- Szintillationsgefäße, wie oben
- Szintillationszähler Packard Tri Carb Liquid Scintillation Spectrometer B 2450, wie oben
- Radioaktive <sup>3</sup>H - TdR - Lösung, wie oben
- NaCl 0,9 %

### 3.3.2.2. Methode

Bestimmung des 3H - TdR - Einbaus in KM - Zellen in autologem Serum (nach SAUER, Arbeitsunterlagen):

Circa 1 ml Knochenmarkpunktat werden aus der Punktionspritze in ein steriles Glas gegeben und sofort mit einem Glasstab defibriniert. Der Fibrinklumpen wird verworfen. Zur Auflösung von Bröckelchen zieht man die gerinnungsfreie Suspension einmal durch eine dünne Injektionsnadel und spritzt sie wieder zurück. Es sollen sich keine Bröckel mehr in der Zellsuspension befinden. In einer Leukomischpipette zieht man bis zur Marke 1 auf, Essigsäure 3 % bis Marke 101 und zählt nach dem Durchmischen in der Neubauer - Zählkammer aus, addiert die Werte der 4 Eckquadrate und multipliziert mit 50. Die gewünschte Zellzahl beträgt hier  $10.000/\text{mm}^3$  und wird mit autologem Serum, gewonnen durch eine gleichzeitig mit der Punktion erfolgte Blutabnahme, eingestellt. Die Ausgleichsformel ist die gleiche wie bei Methode A.

Anschließend werden folgende gleiche Ansätze hergestellt:

|                   | Leerwert | Hauptwert |
|-------------------|----------|-----------|
| Zellsuspension    | 0,1 ml   | 0,1 ml    |
| 3H - TdR - Lösung | 0,01 ml  | 0,01 ml   |

Die Ansätze werden in Eppendorf - Reaktionsgefäße pipettiert. Von den Leerwerten werden sofort nach dem Mischen 0,02 ml herausgenommen und 1 ml eiskalte NaCl dazugegeben. Diese Lösung wird sofort auf ein Millipore - Filter pipettiert und filtriert. Die Hauptwertansätze inkubiert man bei 37 Grad C im Brutschrank für 2 Stunden. Danach werden sie genau wie die Leerwertansätze behandelt, d.h. 0,02 ml herausgenommen, in 1 ml eiskalte NaCl gebracht und auf die Filterscheibchen pipettiert. Für den Standard mischt man 0,01 ml 3H - TdR - Lösung mit 0,09 ml NaCl 0,9 % (Verdünnung 1:10), nimmt davon 0,02 ml, gibt sie auf ein Filter, trocknet sofort und behandelt dann wie bei den anderen Ansätzen weiter.

Jedes Filter wird in der Millipore - Anlage dreimal mit je 2 ml Trichloressigsäure 5 % und dreimal mit je 2 ml HCl 0,1 N gewaschen. Die Lösungen müssen immer gekühlt sein. Die gewaschenen Filter werden dann in den Szintillationsgefäßen bei 80 Grad C 20 Minuten lang getrocknet. Nach dem Abkühlen wird mit 10 ml Szintillationslösung aufgefüllt, nochmals gekühlt, dann gezählt. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\text{CPM (Hauptwert - Leerwert)} \times 200}{\text{cpm}_{\text{Stand.}} \times \text{eingesetzte Zellzahl } (10^7)} = \text{nMol/2 Std/ } 10^{10} \text{ Zellen}$$

### 3.4. 3H - THYMIDIN - MARKIERUNGSINDEX: AUTORADIOGRAPHIE

#### 3.4.1. Material

- TCM 199 HEPES - Medium (Fa. Gipro-bio-cult, Glasgow)
- 3H - TdR - Lösung : spezifische Aktivität 5 Ci/mmol, radioaktive Konzentration 1 mCi/ml (Fa. Amersham Buchler)
- 3H - TdR - Gebrauchslösung: 1 ml 3H - TdR - Lösung mischen mit 9 ml H<sub>2</sub>O bid., einfrieren in Portionen zu 0,5 ml
- NaCl 0,9 %, eiskühlt
- Methanol und Aqua bidest.
- Gelatine - Lösung 0,5 %
- Äthanol 70 % und 96 %
- Kodak AR 10 Stripping Film (Kodak Ltd. London)
- Schneideplatte, Filterpapier, Messer, Pinzette
- Entwickler : 9 g Amidol (Merck 3019), 36 g Natriumsulfit (Merck 6657), 16 ml Kaliumbromid (10 % Lösung), 2 l H<sub>2</sub>O bid.
- Fixierer : 60 g Kaliumdisulfit, 600 g Natriumthiosulfat (Merck 6513), 2 g Chromalaun (Merck 1035) und 2 l H<sub>2</sub>O bidest.
- Färbelösung nach GIEMSA : 3 ml Azur - II - Eosin, 0,8 ml Azur II Glyzerin 250 ml, Methanol 250 ml in weißer Pufferlösung : 5 ml weißer Puffer nach WEISE ad 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- KC - Trockenperlen, Kieselgel in Perlform, SiO<sub>2</sub>, ca. 97 % Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ca. 3 %, mit Indikator (Fa. Roth)

### 3.4.2. Methode

Prinzip: Die während einer bestimmten Inkubationszeit sich in der S - Phase befindenden Zellen bauen im Zuge der DNS - Synthese radioaktiv markiertes Thymidin in die Matrix ein. Als besonders zur Markierung geeignet hat sich Tritium ( $^3\text{H}$ ) erwiesen. Der extrem weiche Beta - Strahler hat durch seine niedrige mittlere Energie von 6 keV ein großes Auflösungsvermögen von ca. 0,7 nm ( $10^3$ ). Die Strahlung des Isotops in den markierten Kernen schwärzt punktförmig einen über das Präparat gebrachten Film. Nach Entwicklung des Films und Färbung der Ausstriche ist eine quantitative Auswertung im Sinne des Markierungsindex möglich.

Ausführung: Nach der Zellzählung werden  $3 - 4 \times 10^6$  Zellen aus dem Knochenmark - Magnesium - Titriplex - Gemisch oder aus dem defibrinierten Knochenmark (nach Zählung) in 1,9 ml TCM - Medium 199 überführt. Dann wird 0,1 ml  $^3\text{H}$  - TdR - Gebrauchslösung (entsprechend 10 nCi) dazugegeben und nach dem Mischen eine Stunde bei 37 Grad C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe von eiskalter NaCl die Reaktion gestoppt und das nicht eingebaute  $^3\text{H}$  - TdR durch Zentrifugation bei 800 rpm für 5 Minuten zweimal ausgewaschen. Die Überstände werden verworfen, aus dem letzten Sediment Ausstriche angefertigt, die erst luftgetrocknet und dann für 20 Minuten in Methanol fixiert, sowie für 20 Minuten in Aqua bid. gewässert werden. Die Rückseite der Präparate bestreicht man mit 0,5 % Gelatine - Lösung, damit bei der weiteren Verarbeitung der Film besser haftet. Nun erfolgt die Beschichtung mit dem Kodak AR 10 Stripping-Film: Einlegen der Filmplatte mit der Beschichtung nach oben für 5 Minuten in 70 % Äthanol, Zerteilen des Filmes in der Schneideplatte mit einem scharfen Messer in acht gleiche Teile und zum Lösen der Filmschicht Eintauchen in 96 % Äthanol für 5 Minuten; Einbringen der einzelnen Stücke mit der Filmschicht nach unten in eine Schale mit destilliertem Wasser und faltenfreies Aufziehen der schwimmenden Filmstückchen auf

einen Objektträger mit einem Ausstrich. Dieser Vorgang erfordert zur Vermeidung von Artefakten große Sorgfalt und eine gewisse Übung. Das Wasser muß nach jeder Filmplatte, die Alkohole nach jeder fünften Platte gewechselt werden.

Darauf werden die Präparate 3 Stunden im Brutschrank bei 30 Grad Celsius getrocknet und anschließend in lichtdicht verschlossenen mit Kieselgel gefüllten Kästchen für 7 Tage bei 4 Grad C exponiert. Jetzt wird der Film durch sechsminütiges Einlegen in die Entwicklerlösung entwickelt; dann folgt ein zwanzigminütiges Fixierbad und 2 Stunden Wässern, sowie 2 Stunden Trocknen der Präparate. Danach färbt man die Präparate für 25 Minuten in gepuffelter Giemsa - Lösung. Der Restfilm auf der Rückseite der Objektträger muß noch mit dem Messer entfernt werden. Das Auszählen der luftgetrockneten Präparate erfolgt unter dem Mikroskop unter Verwendung eines Öl - Immersions - Objektivs (Plan 100/1,25) (47,103).

#### 3.4.3. Bestimmung des 3H - Thymidin - Markierungsindex

Unter dem Markierungsindex (Labeling Index) versteht man das prozentuale Verhältnis von markierten Zellen zur Gesamtzellzahl:

$$\frac{\frac{n}{m}}{n} \times 100 = \text{M.I.}$$

Pro Autoradiographie - Präparat werden 500 bis 1000 proliferierende Zellen ausgezählt, pro Versuch mindestens 2 Präparate. Die Zahl von Silberkörnern pro Kern, von der an eine Zelle als markiert gezählt wurde, betrug - entsprechend den jeweiligen Backgroundbestimmungen - fünf (38, 78, 103). Eine quantitative Silberkornzählung wurde nicht durchgeführt.

### 3.5. DNS - VERTEILUNGSMUSTER: DURCHFLUSSZYTOPHOTOMETRIE

#### 3.5.1. Material

- Propidiumjodid - Lösung: 50 mg Propidiumjodid in 1 Liter 0,1 % Natrium - Citrat - Lösung auflösen; in dunkler Flasche bei 4 Grad Celsius mindestens 1 Monat haltbar.
- 0,1 % Natrium - Citrat - Lösung: 1 ml 3,313 % Natrium - Citrat - Lösung (Fa. Braun - Melsungen) und 30,3 ml H<sub>2</sub>O bid.
- Minifuge (Heraeus Christ)
- Cytofluorograf 4800 A (Fa. Biophysics)
- Laborrechner Plurimat N mit Multi 20 (Fa. Deutsche Inter-technique)

#### 3.5.2. Methode

Prinzip: Zellen werden in einem stark hypotonen Milieu suspendiert, wodurch ein Aufbrechen der Zellmembran erfolgt, so daß Zellinhaltsstoffe wie RNS, DNS und Proteine spezifisch und stöchiometrisch proportional zu ihrer Menge mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden können (57). Die Zellsuspension der fluorochromierten Zellen wird nun durch eine Durchflußkammer geleitet, auf die ein Strahl aus Fluoreszenz anregendem Laserlicht gerichtet ist. Der dabei erzeugte Emissionsstrahl der fluorochromierten Zellkernbestandteile wird aufgefangen und von einem Photomultiplier in elektrische Impulse umgewandelt. Pro Sekunde kann man eine exakte Mengenbestimmung, z.B. der DNS pro Zellkern, bei 1000 bis 5000 Zellen vornehmen. Da die Zellen, den Zyklusphasen entsprechend, einen verschiedenen Gehalt an DNS aufweisen, ist, durch mathematische Methoden abgrenzbar, eine Einteilung in diploide G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>- Zellen, in hyperdiploide S - Zellen, sowie in tetraploide G<sub>2</sub>- und M - Zellen möglich (86).

Durchführung: Zellreiches, durch Defibrinierung oder Mg - Titriplex gerinnungsgehemmtes Knochenmarkpunktat (0,5 - 1 ml) wird in soviel Propidiumjodid - Lösung gegeben, daß eine Konzentration von circa 100 kernhaltigen Zellen/mm<sup>3</sup> erreicht wird. Zell-

armes Punktat wird 5 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in Propidiumjodid - Lösung suspendiert. Nach Inkubation der Probe - mindestens 15 Minuten bis 24 Stunden bei 4 Grad C - erfolgt die Messung der Fluoreszenz - Intensität der Zellen im Cytofluorograph bei einer Durchflußrate von maximal 500 Zellen pro Sekunde. DNS - spezifisch ist dabei die rote Fluoreszenz mit der Wellenlänge von mehr als 610 nm. Die Datenerfassung und die Auswertung der DNS - Häufigkeitsverteilungen, dargestellt in DNS - Histogrammen (Abb. 5), erfolgt mit einem Laborrechner (77).

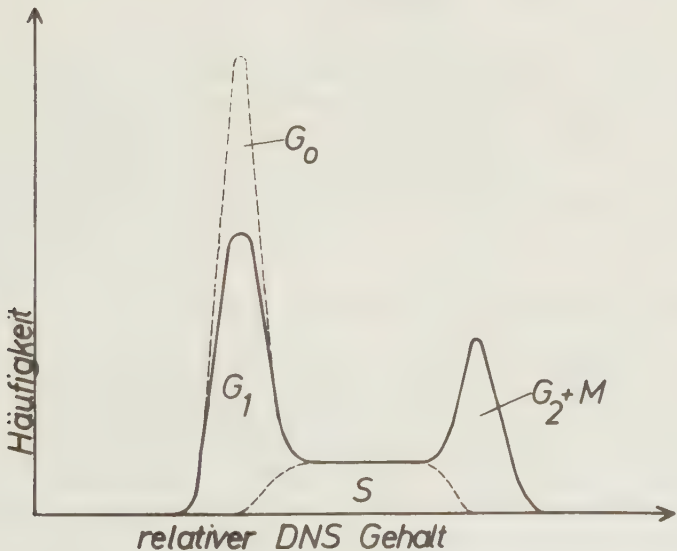


Abb. 5: Schematische Darstellung eines mittels Durchflußzytometer und Laborrechner erstellten DNS- Histogramms.

Auswertung: Die DNS - Histogramme werden nach einer Methode von FLEISCHER und PELKA (29) ausgewertet. Hierbei wird die Form der S - Phase unverändert zwischen 2 Punkten übernommen, die von der Standardabweichung der  $G_0$ - und  $G_1$ - Peaks abhängen. Die Überlappungen der S - Phase mit den  $G_0$ - und  $G_1$ -, sowie den  $G_2$ - und M - Phasen sind charakterisiert durch integrierte Gauß - Funktionen, die an die Endpunkte des unveränderten Teils der S - Phase angepaßt sind. Die Ergebnisse werden in Prozentwerten der in der jeweiligen Phase befindlichen Zellen angegeben.

### 3.6. MORPHOLOGISCHE KNOCHENMARKDIFFERENZIERUNG

#### 3.6.1. Ausstriche und Färbung

Die in der Uhrglasschale sichtbaren Markbröckel werden sofort auf entfettete Objektträger gegeben und nach Absaugen des peripheren Blutes mit einem zweiten Objektträger dünn ausgestrichen. Die Fixierung und Färbung erfolgt nach der Methode von PAPPENHEIM (kombinierte MAY - GRÜNWALD - GIEMSA - Färbung) (24).

#### 3.6.2. Bestimmung der Myelopoese - Verteilung

Die gefärbten Ausstriche werden unter dem Mikroskop mit dem Objektiv 100/1,25 und Öl - Immersion ausgewertet. Pro Ausstrich werden jeweils mindestens 300 Zellen differenziert, die wie üblich eingeteilt wurden in Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten als Zellen des Proliferationsspeichers, Metamyelozyten, Stab- und Segmentkernige als Zellen des Reifungsspeichers und segmentierte Neutrophile als dem peripheren Kompartiment angehörige Zellen (5).

### 3.6.3. M / E - Quotient

Das Verhältnis der myeloischen zu den erythropoetischen Vorstufen im Knochenmark wird in den gleichen Ausstrichen ermittelt. Ausgezählt werden die Proerythroblasten und polychromatische Normoblasten als Zellen der Erythropoese und Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten als Zellen der Myelo-poese. Die ermittelten absoluten Zahlen werden auf 100 Zellen bezogen und dann der Quotient gebildet (66).

### 3.7. WACHSTUM GRANULOPOETISCH DETERMINIERTER STAMMZELLEN: CFUC

#### 3.7.1. Material

- Mc Coy - Medium mit Zusätzen
- Mc Coy - Medium 100,00 ml
- Sodium bicarbonat 0,75 ml
- Sodium pyruvat 1,25 ml
- Eagles MEM vitamine 0,50 ml
- Eagles MEM amino acids 1,00 ml
- Eagles MEM non ass. amino acids 0,50 ml
- Eagles MEM Glutamine 0,50 ml
- L - Serine (21 mg/ml Mc Coy) 0,05 ml gelöst haltbar
- L - Asparagine (10 mg/ml Mc Coy) 0,20 ml 14 Tage bei
- Penicillin - Streptomycin 1,50 ml 4 Grad C
- Alle Zusätze von der Fa. Gibco.
- 15 % Fetales Kälberserum FCS (Gibco)
- Medium TC 199 (Gibco)
- 0,3 % Bacto - Agar (Difco)
- Ficoll Isopaque, Dichte 1,077 (Seromed)
- Türck'sche Lösung (Merck)

### 3.7.2. Methode

Prinzip: Das Wachstum myeloisch determinierter Stammzellen des menschlichen Knochenmarks kann mittels Inkubation in Halbflüssigkulturen in vitro beobachtet und sogar quantifiziert werden. Die aus dem Knochenmarkpunktat gewonnenen mononuklearen Zellen werden in definierter Anzahl in ein Kulturmedium gegeben und unter speziellen Bedingungen in Kulturschalen inkubiert. Nur durch den Zusatz eines wachstumsstimulierenden Faktors (CSF) kommt es zur Proliferation der Stammzellen; d.h. die zu Proliferation und Differenzierung befähigten Zellen bilden in der oberen Agarschicht mikroskopisch sichtbare Zellhaufen, sogenannte Cluster Zellaggregate mit weniger als 50 Zellen, oder Kolonien, Zellaggregate mit mehr als 50 Zellen (102). Als Wachstumsfaktor CSF (colony stimulating factor) verwendet man entweder HPCM (human placenta conditioned medium 65) oder wie bei uns, menschliche periphere Leukozyten (102).

Durchführung: Aus den Knochenmarkpunktaten werden die mononuklearen Zellen MNZ nach der Methode von BOYUM (6) über Ficoll Isopaque isoliert und zweimal in Medium Tc 199 gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung mit Türck'scher Lösung kultiviert man  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^5$  MNZ in Mc Coy - Medium mit Zusätzen, das vorher steril filtriert wird, sowie mit fetalem Kälberserum FCS in 0,3 % igem Bacto - Agar nach der Methode von PIKE und ROBINSON (79).

Als CSF wird 0,5 % iger Agar - underlayer, der  $1 \times 10^6$  periphere MNZ mit 40 % Granulozyten von Normalpersonen enthält, zugesetzt. Diese Konzentration ergibt optimale Stimulierung. Die Kulturschalen inkubiert man über 10 Tage bei 37 Grad C und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in einer 5 % igen  $\text{CO}_2$ - Atmosphäre. Nach der Inkubation erfolgt die Zählung der Cluster und Kolonien mit einem Diavert - Mikroskop. Gewertet werden nur die Kolonien.

### 3.8. ÜBERWACHUNG DES PERIPHEREN BLUTBILDES

Zur Feststellung eventueller toxischer Wirkungen der HU - Infusion auf die Zellen des peripheren Blutes wurde bei den Patienten meist im Rahmen der auf Station notwendigen Blutentnahmen vor der HU - Gabe einmal und nach HU durchschnittlich fünfmal in bis zu 4 Wochen das kleine Blutbild bestimmt. Dieser Längsschnitt wurde öfter durch den, von unseren Untersuchungen unabhängigen Beginn einer Zytostatika - Therapie limitiert.

### 3.9. LEBERENZYME UND HALBWERTSZEIT VON HYDROXYUREA

Zur Ermittlung der Serumwerte von Leberenzymen (als Zustandsparameter der Leber) wurde auf die auf den Stationen erhobenen klinischen und laborchemischen Daten zurückgegriffen.

Als Voraussetzung für die HU - Infusion galt, daß die Patienten keine nachweisbaren Lebermetastasen und keine oder nur geringfügige andere Erkrankungen des Leberparenchyms hatten. Zum Vergleich wurden schließlich nur die Leberenzym - Werte von Serum - GOT, Serum - GPT und Gamma - GT herangezogen, die alkalische Phosphatase erwies sich aufgrund des mehrmaligen Vorliegens von Knochenmetastasen als unbrauchbar, die Cholinesterase war nicht durchgehend bestimmt worden.

### 3.10. STATISTIK

Zur statistischen Absicherung der Meßdaten bedienten wir uns meist des Wilcoxon - Tests für Paardifferenzen (Wilcoxon - Matched - Pairs Signed - Ranks Test). Hiermit kann ein Vergleich zweier abhängiger Stichprobenreihen, die nicht einer Normalverteilung gehorchen, vorgenommen werden; sollte eine Normalverteilung vorgelegen haben, so ist dieser Test fast genauso scharf wie der dann übliche T - Test für abhängige Reihen (98). Der Wahrscheinlichkeitsgrad, mit dem ein Ergebnis statistisch zu sichern ist, liegt bei diesem Test im 1 % - Niveau ( $P < 0,01$ ).

Für den Vergleich der beiden Einbauraten - Meßmethoden A und B untereinander wurde der Mann - Whitney - U - Test für zwei unabhängige Stichproben und Nichtnormalverteilungen verwendet (98). Außerdem wendeten wir einmal den rechnerischen Ausreißer - Nachweis nach DOERFFEL an, um systematisch bedingte Fehler oder Meßfehler zu eliminieren (93).

Gerechnet wurde mit dem Tischcomputer Hewlett - Packard 9866 A des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik (ISB) der Universität München.

#### 4. VERSUCHSAUFBAU

##### 4.1. HYDROXYUREA - INFUSION

Pro Versuchseinheit wurde den insgesamt 20 Patienten nach Aufklärung und Einverständniserklärung HU in einer 10-stündigen oralen Dauerinfusion appliziert. Vor, während und nach der Infusion, insgesamt dreimal, wurde Knochenmark durch Aspiration entnommen. Außerdem wurden zwischen 5 und 10 mal Blutentnahmen von je 3 ml aus einer Cubitalvene vorgenommen.

Alle 20 Patienten im Alter zwischen 20 und 69 Jahren litten an disseminierten Tumoren, hatten aber nach dem Stand der Voruntersuchungen keine Infiltration des Knochenmarks und keine Lebermetastasen. Zudem waren sie noch nicht mit Zytostatika vorbehandelt oder vorbestrahlt. Die Blutwerte der harnpflichtigen Substanzen Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin und der Elektrolyte lagen im Normbereich.

Für jeden Patienten mußte die entsprechende HU - Gabe vorher festgelegt werden. Für den als erstes zu verabreichenden "push" wurden 25 mg Hydroxyurea reinst pro Kilogramm Körpergewicht in 50 ml leicht vorgewärmten sterilem Aqua pro infusione (Ampuwa<sup>R</sup>) in einer 50 ml - Plastikspritze gelöst. Für die Dauerinfusion über 10 Stunden wurden 5 mg HU pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde in einer 500 ml Infusionsflasche mit Aqua pro infusione aufgelöst. Außerdem wurden noch 5 % der HU - Menge in 5 % der

Wassermenge als Ersatz für die am Infusionsende im Infusionssystem zurückbleibende HU - Lösung hinzugefügt. Die HU - Lösungen wurden jeweils frühestens 1 Stunde vor Infusionsbeginn frisch angesetzt und die HU - Infusionsflasche zur Vermeidung von beschriebenen Reaktionen von Licht mit länger stehenden HU - Lösungen mit Alufolie umgeben (95).

Auf der Station wurde den Patienten pernasal ein dünner Magenschlauch gelegt (Nasogastrische Ernährungssonde K 30, 8 Char. von Pharmaseal, Triest) und sofort die in der 50 ml Spritze gelöste HU - Menge als push injiziert, dann die Infusionsflasche mit dem entsprechenden Besteck über einen Infusomaten an den Magenschlauch angeschlossen. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 50 ml pro Stunde. Nach 10 Stunden kontinuierlicher Infusion wurde der Magenschlauch gezogen.

#### 4.2. BESTIMMUNG DER HYDROXYUREA - HALBWERTSZEIT

Den Patienten wurde im Zeitraum 1 Stunde bis 9 Stunden nach Infusionsbeginn mehrere Male 3 ml Venenblut aus der Regio cubitalis zur Bestimmung des Blutspiegels von HU entnommen. Die ab der 10. Stunde, dem Infusionsende, bis zur 16. Stunde festgestellten Blutwerte wurden semilogarithmisch als Funktion der Zeit aufgetragen. Aus der sich ergebenden linearen Eliminationskurve von HU (99) konnte dann die Halbwertszeit ermittelt werden (Abb. 7).

#### 4.3. BESTIMMUNG DER HYDROXYUREA - EINWIRKDAUER

Die Blockdauer konnte direkt aus dem semilogarithmischen Protokollblatt abgelesen werden. Sie ergab sich aus der Abszissenstrecke vom Zeitpunkt des Infusionsbeginns bis zum Schnittpunkt der HU - Eliminationskurve mit der Linie der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei  $1,5 \times 10^{-4}$  M (Abb. 6). Die MHK war an menschlichen Leukämiezellen bestimmt worden (91,99) und wurde als, fuer auf normale Knochenmarkzellen übertragbar, angenommen (38).

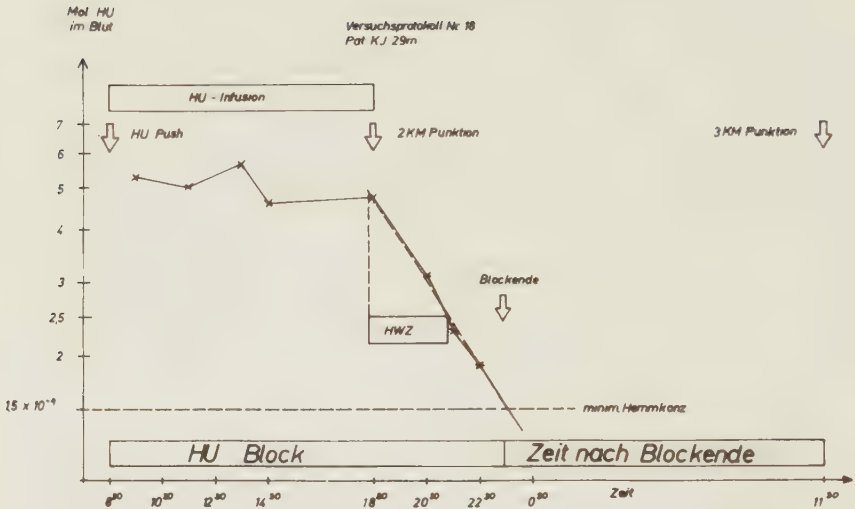


Abb. 6: Versuchsablauf bei einem Patienten mit HU - Blutspiegelbestimmung und Darstellung von Wirkungsdauer (HU - Block) und Halbwertszeit (HWZ)

#### 4.4. ZEITLICHE FOLGE DER KNOCHENMARKPUNKTIONEN

Zur Bestimmung der Ausgangswerte war eine Punktion vor der HU - Gabe notwendig, die am Tag vor der Infusion vorgenommen wurde. Die 2. Punktion sollte zu einem Zeitpunkt erfolgen, an dem die Knochenmarkzellen noch direkt unter dem Einfluß von HU standen. Daher wurden die meisten Zweitpunktionen nach der 10. Stunde, dem Punkt des Infusionsendes, durchgeführt, wo noch mit einer sicheren DNS - Inhibition zu rechnen war. Bei den restlichen Patienten wurde die 2. Punktion zwischen 4 Stunden und 18 Stunden nach HU - Beginn durchgeführt, um eine möglichst breite Spanne abzudecken. Die Drittpunktionen mußten so gelegt werden, daß möglichst die Veränderungen nach Aufhebung der HU - Wirkung erfaßt werden konnten. Daher lagen die Zeiten für die 3. Punktion zwischen 24 Stunden und 31 Stunden nach HU - Infusionsbeginn, d.h. zwischen 2 Stunden und 16,5 Stunden nach Unterschreiten der minimalen Hemmkonzentration.

Da den Patienten regelmäßige Blutabnahmen oder gar eine Knochenmarkpunktion zwischen 22 Uhr und 7 Uhr morgens nicht zugemutet werden sollte, mußten jeweils nach Festsetzung der Termine für den Infusionsbeginn und die 2. Punktion exakte, modifizierte Zeitpläne erstellt werden (siehe Versuchsprotokoll). Der Zeitpunkt für die 3. Punktion wurde meist erst festgelegt, nachdem die HU - "Blockdauer" errechnet werden konnte.

#### 4.5. VERTEILUNG DES PROBENMATERIALS

Das auf die oben beschriebene Weise gewonnene Knochenmarkpunktat mußte sofort aus der Aspirationsspritze in die für die jeweiligen Untersuchungen notwendigen Portionen aufgeteilt und in die dafür bereitgehaltenen Gefäße gebracht werden. Im einzelnen: a) Knochenmarkausstriche, b) DNS - Einbauraten, c) Autoradiographie, d) HU - Konzentrationsbestimmung (nur 2.Pu.), e) Durchflußzytophotometrie, f) CFUc - Wachstumsbestimmung. Die Untersuchungen a) bis d) konnten im onkologischen Forschungslabor im Klinikum Großhadern durchgeführt werden, das Material

für e) und f) wurde nach Aufbereitung im Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in München verarbeitet.

Die Durchführung der aufgezählten Untersuchungen erfolgte nach den oben beschriebenen Methoden.

#### 4.6. VERSUCHSPROTOKOLL

Für jeden Versuch wurde zur Dokumentation des zeitlichen Ablaufs ein Versuchsprotokoll angelegt. Nachstehend ein Beispiel:

##### Versuchsprotokoll Nr. 18

Datum: 18.11., 19.11., 20.11.1979

Patient: K.J., 29 m

Körpergewicht: 74 kg

Berechnung der Hydroxyurea - Dosis:

|                                           |   |          |   |                 |   |                  |
|-------------------------------------------|---|----------|---|-----------------|---|------------------|
| Push                                      | : | 25 mg HU | x | 74 kg KG        | = | 1,85 g HU        |
| Infusion                                  | : | 5 mg HU  | x | 74 kg KG x 10 h | = | <u>3,70 g HU</u> |
| Gesamtdosis                               | : |          |   |                 |   | 5,55 g HU        |
| 5 % Ersatz für im Besteck verbleib. Rest: |   |          |   |                 |   | 0,185 g HU       |

##### Versuchsablauf (Abb. 6)

| Datum    | Zeit             | Std. nach<br>HU-Beginn | Maßnahme                      | HU-Konz.<br>$\times 10^{-4}$ M | Einbau<br>cpm |
|----------|------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------|
| 18.11.79 | 8 <sup>30</sup>  | -                      | 1. Punktion                   | -                              | 150,8         |
| 19.11.79 | 8 <sup>30</sup>  | -                      | HU-Infusionsbeginn            | -                              | -             |
|          | 9 <sup>30</sup>  | 1                      | Blutabnahme                   | 5,3                            | -             |
|          | 11 <sup>30</sup> | 3                      | Blutabnahme                   | 5,0                            | -             |
|          | 13 <sup>30</sup> | 5                      | Blutabnahme                   | 5,6                            | -             |
|          | 14 <sup>30</sup> | 6                      | Blutabnahme                   | 4,6                            | -             |
|          | 18 <sup>30</sup> | 10                     | HU-Infusionsende, 2. Punktion | 33,6                           |               |
|          |                  |                        | Blutabnahme                   | 4,8                            |               |
|          | 20 <sup>30</sup> | 12                     | Blutabnahme                   | 3,1                            | -             |
|          | 21 <sup>30</sup> | 13                     | Blutabnahme                   | 2,3                            | -             |
|          | 22 <sup>30</sup> | 14                     | Blutabnahme                   | 1,9                            | -             |
| 20.11.79 | 11 <sup>30</sup> | 27                     | 3. Punktion                   | -                              | 306           |

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. KONZENTRATIONEN VON HU IN BLUT UND KNOCHENMARK

Zwei in dieser Arbeit nicht aufgeführte Vorversuche haben gezeigt, daß die zum Erreichen der gewünschten HU - Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  M theoretisch errechnete Gabe von 38,5 mg HU/kg KG als Push und von 6,5 mg HU/kg KG und Stunde für die 10-stündige Infusion zu hohe Blutwerte von  $7,5 \times 10^{-4}$  M bis  $1,3 \times 10^{-3}$  M ergab. Durch eine Reduktion der Push - Dosis um ein Drittel auf 25 mg HU/kg KG und der Infusionsdosis um ein Viertel auf 5 mg/kg KG und Stunde wurde der gewünschte Wirkspiegel sehr gut erreicht und konnte durch die gleichmäßige 10-stündige perorale Zufuhr von 50 ml/Stunde des in Aqua pro infusione gelösten HU konstant im gewollten Bereich gehalten werden (Abb.7).

Die gemessenen Maximalkonzentrationen von HU im Blut betrugen bei 20 Patienten im Mittel  $5,75 \times 10^{-4}$  M mit einer Standardabweichung von  $s = \pm 0,9 \times 10^{-4}$  M (Tab. 2). Die Maximalwerte, deren Streuung zwischen  $4,5$  und  $8,5 \times 10^{-4}$  M lag, wurden bei 11 Patienten nach der 1. oder 2. Stunde, bei 7 Patienten in der Mitte der HU - Infusion (4. bis 7. Stunde) und bei 2 Patienten am Ende der Infusion (9. und 10. Stunde) gemessen.

Die HU - Werte im Knochenmarkpunktat von 14 Patienten, bestimmt zur 10. Stunde am Ende der Infusion, waren fast immer mit den gleichzeitig ermittelten Blutkonzentrationen identisch, es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ( $P > 5$ ) im Wilcoxon - Test. Der Mittelwert im Blut liegt bei  $5,0 \times 10^{-4}$  M mit  $s = \pm 1,0$ , im Knochenmark bei  $4,8 \times 10^{-4}$  M mit  $s = \pm 1,0$  (Tab. 1).

### 5.2. HALBWERTSZEIT UND WIRKUNGSDAUER VON HYDROXYUREA

Die nach Ende der Infusion gemessenen, semilogarithmisch zur Zeit aufgezeichneten Blutwerte zeigten einen logarithmischen Abfall proportional zur Zeit (Abb. 7). Die Halbwertszeit von

HU betrug nach unserer Behandlung bei 20 Patienten 3 Stunden und 20 Minuten mit  $s = \pm 1 \text{ h } 35 \text{ min.}$

Ein Wert von 8 h 25 min. mußte nach dem statistischen Ausreissernachweis nach DOERFFEL (93) eliminiert werden (8 h 25 min.  $\times x_a = 7 \text{ h } 25 \text{ min.}$ ), d.h. es dürften andere als die sonst geltenden Kriterien zu diesem Wert geführt haben.

Die HU - induzierte DNS - "Blockdauer", d.h. die Zeit in der eine DNS - inhibitorische Wirkung von HU vorliegt, wurde definiert als Zeit vom Beginn der HU - Gabe bis zum Unterschreiten der angenommenen minimalen Hemmkonzentration (MHK) von  $1,5 \times 10^{-4} \text{ M.}$  Im Mittel von 20 Patienten dauerte die HU - bewirkte DNS - Synthese - Inhibition 15 Stunden 25 Minuten ( $s = \pm 1 \text{ Std. } 50 \text{ min.}$ ). Auch hier mußte der Wert von 32 Std. eliminiert werden, da die oben gilt:  $32 \text{ h } \times x_a = 25 \text{ h } 30 \text{ min.}$  (Tab. 2).

### 5.3. LEBERENZYME UND HU - HALBWERTSZEIT

Um eine Beeinträchtigung der HU - Metabolisierung und der Elimination weitgehend auszuschließen, setzten wir eine nicht oder nur wenig eingeschränkte Funktion von Leber und Niere voraus. Die routinemäßig auf der Station bestimmten Werte von Harnstoff und Kreatinin im Serum lagen bei allen Patienten im Normbereich, die Werte für die Leberenzyme GOT waren zweimal grenzwertig, für GPT viermal grenzwertig und einmal deutlich erhöht, für Gamma - GT zweimal grenzwertig und achtmal stärker erhöht. Es ergaben sich jedoch insgesamt keine Korrelationen zwischen einer Erhöhung von Leberenzymwerten und einer verlängerten Halbwertszeit von HU im Blut. Ein Patient mit dem histologischen Befund einer toxisch - nutritiven Fettleber Grad II hatte die kürzeste HWZ, ein anderer mit dem gleichen Befund eine deutlich über die Standardabweichung hinaus verlängerte HWZ und extrem lange Blockdauer. Der Patient mit der längsten Halbwertszeit (8,5 Stunden !) hatte - erst nach unserer Untersuchung verifizierte - Lebermetastasen.

#### 5.4. 3H - THYMIDIN - EINBAURATEN IN DIE DNS

##### 5.4.1. Bestimmung mit Methode A

Bei den 10 Patienten lag der Mittelwert des 3H - Thymidin - Einbaus in die proliferierenden Knochenmarkzellen bei 57,9 nMol/2h/10<sup>10</sup> Zellen, mit einer Standardabweichung von  $\pm 16,3$ . Während der HU - induzierten DNS - Synthese - Inhibition sank die Einbaurrate im Zeitraum von 16 bis 4 Stunden vor Blockende auf durchschnittlich 19,7 nMol/2h/10<sup>10</sup> Zellen mit  $s = \pm 8,6$ ; dies entspricht einer Reduktion auf 35 % des Ausgangswertes (n = 7).

Bereits eine, bzw. zwei Stunden nach dem angenommenen Blockende wurde bei 4 Patienten mit 54,7 nMol/2h/10<sup>10</sup> Zellen ( $s = \pm 15,4$ ), entsprechend 94,4 %, der Ausgangswert fast wieder erreicht. Im Zeitraum von der 7. bis zur 12. Stunde nach Blockende stieg das Mittel der Einbauraten bei 8 Patienten auf 145,0 % des Ausgangswertes, gleich 82,3 nMol/2h/10<sup>10</sup> Zellen.

Zum Zeitpunkt 16,5 Stunden nach Blockende war der Einbau bei 1 Patienten bei 50 %, möglicherweise also bereits wieder reduziert. Die durchschnittliche Einbaurrate ab der 7. Stunde lag zusammengefaßt bei 9 Patienten bei 77,4 ( $s = \pm 35,2$ ). Davon zeigte sich bei 3 Patienten kein nennenswerter Anstieg, bei den anderen jedoch Steigerungen bis zu 191 % vom Ausgangswert. (Tab. 3 und Abb. 8).

Als hochsignifikant erwies sich die Erniedrigung während der HU - Infusion ( $P < 0,01$ ), als nicht signifikant die Änderung kurz nach Blockende ( $P > 0,5$ ), als signifikant die Steigerung ab der 7. Stunde ( $P < 0,5$ ).

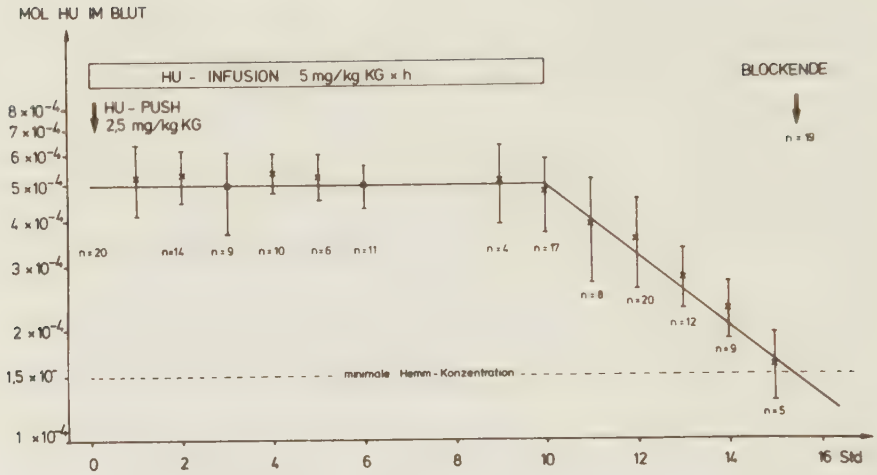


Abb. 7: Hydroxyurea - Konzentration im Blut während und nach 10-stündiger Infusion (Mittelwerte mit Standardabweichung)

#### 5.4.2. Bestimmung mit Methode B

Bei weiteren 10 Patienten wurde die Messung des DNS - Einbaus von 3H - Thymidin im autologen Serum vorgenommen, da die Reduktion des Einbaus während der HU - Wirkung auf 1/3 der Ausgangswerte bei Verwendung der Methode A zu gering und möglicherweise methodisch bedingt erschien, da die Knochenmarkzellen in HU - freiem Medium verarbeitet wurden.

Nun wurde eine mittlere Einbaurrate von  $14,77 \text{ nMol}/2\text{h}/10^{10}$  Zellen vor HU gemessen ( $s = \pm 6,81$ ). Im Bereich 4 bis 10 Stunden vor "Blockende", also während der HU - Einwirkung, erniedrigten sich die Werte auf 2,3 mit  $s = \pm 1,36$ , entsprechend nur noch 15,6 % des Ausgangswertes. 7 bis 14 Stunden nach dem angenommenen "Blockende" stieg der Einbau auf durchschnittlich 17,35 ( $s = \pm 8,50$ ), d.h. auf 117,5 %. Hiervon erreichten die Einbauraten von 4 Patienten die Ausgangswerte nicht, während sie bei anderen 4 Patienten sehr deutliche Anstiege auf bis zu 203 % aufwiesen.

Die Erniedrigung während HU - Applikation war gegenüber den Ausgangswerten hochsignifikant ( $P < 0,01$ ), die Steigerung nach HU nicht signifikant ( $P > 0,5$ ). (Tab. 4 und Abb. 8).

Das Zustandekommen der im Vergleich zu Methode A bei den Ausgangswerten um den Faktor 3,8 niedrigeren Absolutwerten in  $\text{nMol}/2\text{h}/10^{10}$  Zellen ist nicht geklärt. Diese Tatsache ergibt sich jedoch durchgehend, nach HU - Wirkungsende beträgt der Faktor 4,4. Es ist bei der Inkubation im autologen Serum an eine Eiweißbindung von 3H - Thymidin zu denken, so daß weniger Substrat zum Einbau in die Zellen zur Verfügung steht.

#### 5.5. 3H - THYMIDIN - MARKIERUNGSINDEX

Bei 12 Patienten konnte autoradiographisch der Markierungsindex der proliferierenden Knochenmarkzellen bestimmt werden (Tab. 5).

Die proliferierenden Zellen der 1. Punktion zeigten insgesamt einen MI von 31,8 % mit einer Standardabweichung von  $\pm 5,6$ . Während der kontinuierlichen Gabe von HU reduzierte sich der Anteil der markierten Zellen auf 17,9 %,  $s = \pm 9,0$ , d.h. auf

56,3 % des Ausgangswertes. Im Zeitraum 1- 2 Stunden nach Blockende befanden sich 38,6 % ( $s = \pm 6,9$ ) in der DNS - synthetisierenden Phase, entsprechend 121,4 % des Ausgangswertes ( $n = 3$ ). Dann stieg der Markierungsindex auf 49,6 % ( $s = \pm 9,3$ ), sodaß sich 7 - 14 Stunden nach Blockende der Anteil der markierten Zellen auf 156 % des O - Wertes erhöhte.

Sowohl die Reduktion während HU, als auch die Erhöhung ab der 7. Stunde nach HU waren hochsignifikant ( $P < 0,01$ ). (Abb. 8).

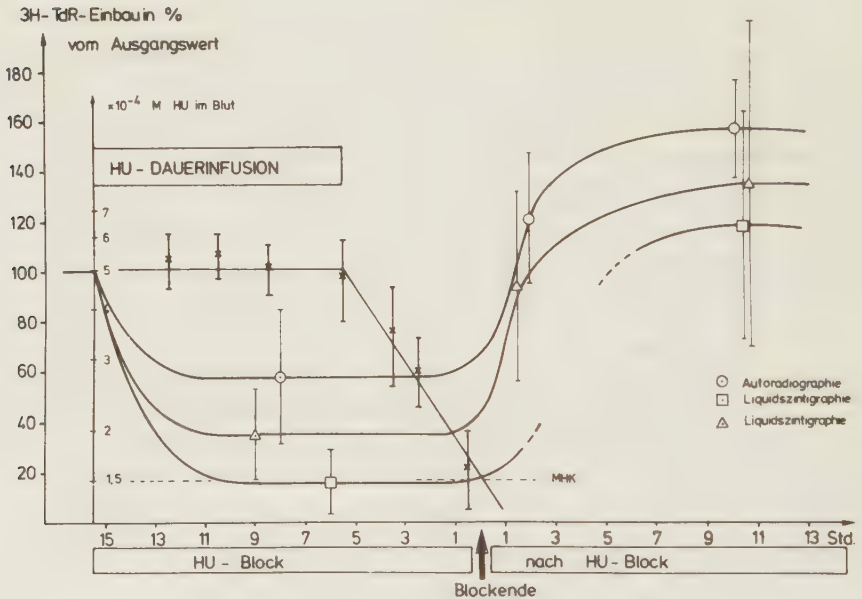


Abb. 8: Liquidszintimetrische 3H - TdR - Einbauraten und autoradiographischer 3H - TdR - Markierungsindex menschlicher Knochenmarkszellen während und nach HU - Einwirkung bei jeweils 10, bzw. 12 Patienten (Mittelwerte mit Standardabweichung) (Kreise - Autoradiographie, Quadrate = Liquidszintigraphie mit Methode B, Dreiecke = Liquidszintigraphie mit Methode A)

Tab. 1: HU - Konzentrationen im Knochenmark und Blut  
 Vergleich der Meßwerte nach 10 Std. peroraler  
 Dauerinfusion (mit Mittelwerten und Standard-  
 abweichung,  $n = 14$ )

| Patient     | HU-Konzentration ( $\times 10^{-4} \text{M}$ ) |                                  |
|-------------|------------------------------------------------|----------------------------------|
|             | Knochenmark                                    | Blut                             |
| P.N. 47 m   | 6,2                                            | 6,3                              |
| S.G. 40 w   | 5,3                                            | 5,3                              |
| S. KD. 20 m | 4,5                                            | 4,5                              |
| B.A. 51 m   | 4,5                                            | 4,9                              |
| H.J. 68 m   | 4,3                                            | 4,3                              |
| H.K. 69 m   | 3,8                                            | 5,8                              |
| W.O. 44 m   | 4,6                                            | 4,7                              |
| P.A. 57 w   | 5,1                                            | 4,9                              |
| R.R. 66 m   | 6,6                                            | 7,0                              |
| F.W. 59 m   | 5,3                                            | 5,3                              |
| Ho.M. 62 m  | 3,1                                            | 3,0                              |
| K.J. 29 m   | 5,9                                            | 4,8                              |
| N.A. 23 m   | 3,7                                            | 4,0                              |
| Hu.M. 43 w  | 4,4                                            | 4,3                              |
| $n = 14$    | $\bar{x} = 4,8$<br>$s = \pm 1,0$               | $\bar{x} = 5,0$<br>$s = \pm 1,0$ |

Tab. 2: Pharmakokinetik von HU

Maximale erreichte Konzentration im Blut, Halbwertszeit und Wirkungsdauer bei 10-stündiger peroraler Infusion (mit Mittelwerten u. Standardabweichung, n=20)

| Patient   |      | Max. HU-Konz.<br>$\times 10^{-4}$ M | Halbwertszeit<br>in Std. u.Min. | Wirkungsdauer<br>in Std. u. Min. |
|-----------|------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| K.M.      | 67 m | 8,5                                 | 3 h 05 min                      | 17 h 00 min                      |
| D.M.      | 20 m | 5,8                                 | 2 h 45 min                      | 16 h 15 min                      |
| H.G.      | 42 m | 5,7                                 | 1 h 25 min                      | 14 h 15 min                      |
| St.H.     | 42 m | 5,9                                 | 1 h 55 min                      | 11 h 45 min                      |
| P.N.      | 47 m | 6,9                                 | 3 h 25 min                      | 14 h 30 min                      |
| T.S.      | 56 m | 5,1                                 | 2 h 55 min                      | 14 h 30 min                      |
| W.L.      | 65 m | 6,4                                 | 7 h 05 min                      | 32 h 00 min (A)                  |
| Sch.H.    | 56 m | 4,9                                 | 4 h 35 min                      | 14 h 45 min                      |
| S.KD.     | 20 m | 4,5                                 | 3 h 45 min                      | 15 h 45 min                      |
| B.A.      | 51 m | 4,9                                 | 3 h 00 min                      | 14 h 45 min                      |
| H.J.      | 68 m | 5,4                                 | 3 h 25 min                      | 15 h 45 min                      |
| H.K.      | 69 m | 5,8                                 | 3 h 15 min                      | 17 h 15 min                      |
| W.O.      | 44 m | 5,5                                 | 3 h 20 min                      | 15 h 30 min                      |
| P.A.      | 57 w | 5,5                                 | 2 h 40 min                      | 13 h 50 min                      |
| R.R.      | 66 m | 7,0                                 | 4 h 30 min                      | 20 h 00 min                      |
| F.W.      | 59 m | 6,2                                 | 3 h 05 min                      | 15 h 30 min                      |
| Ho.M.     | 62 m | 5,3                                 | 8 h 25 min (A)                  | 18 h 30 min                      |
| K.J.      | 29 m | 5,6                                 | 2 h 55 min                      | 15 h 00 min                      |
| N.A.      | 23 m | 4,6                                 | 2 h 40 min                      | 14 h 00 min                      |
| Hu.M.     | 43 w | 5,6                                 | 2 h 50 min                      | 14 h 00 min                      |
|           |      | n = 20                              | n = 19 (ohne A)                 | n = 19 (ohne A)                  |
| $\bar{x}$ |      | 5,75                                | 3 h 20 min                      | 15 h 25 min                      |
| s         |      | $\pm$ 0,90                          | $\pm$ 1 h 35 min                | $\pm$ 1 h 50 min                 |

Tab. 3: 3H - Thymidin - Einbauraten menschl. Knochenmarkzellen vor, während und nach HU - Infusion (Methode A, gewasch. u. resuspend. Zellen) Messdaten in nMol 3H - TdR/2 h/ 10<sup>10</sup> Zellen und in % vom O - Wert  
x = Mittelwerte mit Standardabweichung (s), n = 10, 7, 4, 9

| Pat.           | vor HU (O-Wert)                 |                      |                                 |                 | während HU            |                                 |                 |                       | nach HU                         |                 |                       |                                 |                 |
|----------------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------|
|                | nMol/2h/<br>10 <sup>10</sup> Z. | Std.vor<br>"B.-Ende" | nMol/2h/<br>10 <sup>10</sup> Z. | % vom<br>O-Wert | Std.nach<br>"B.-Ende" | nMol/2h/<br>10 <sup>10</sup> Z. | % vom<br>O-Wert | Std.nach<br>"B.-Ende" | nMol/2h/<br>10 <sup>10</sup> Z. | % vom<br>O-Wert | Std.nach<br>"B.-Ende" | nMol/2h/<br>10 <sup>10</sup> Z. | % vom<br>O-Wert |
| K.M.           | 34,4                            |                      |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 | 152             |
| D.M.           | 63,0                            |                      |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 | 149             |
| H.G.           | 63,3                            |                      |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 | 109             |
| W.L.           | 45,8                            |                      |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 |                 |                       |                                 |                 |
| St.H.          | 63,1                            | 16                   | 28,9                            | 63              | 2                     | 74,2                            | 162             | 12                    | 62,0                            | 98              |                       |                                 |                 |
| P.N.           | 76,0                            | 4                    | 14,6                            | 23              |                       |                                 |                 | 16,5                  | 38,0                            | 50              |                       |                                 |                 |
| T.S.           | 32,3                            | 6,5                  | 13,0                            | 17              |                       |                                 |                 | 10,5                  | 57,0                            | 176             |                       |                                 |                 |
| Sch.H.         | 60,8                            | 10,5                 | 12,3                            | 38              |                       |                                 |                 | 11                    | 116,0                           | 191             |                       |                                 |                 |
| S.KD.          | 82,5                            | 10                   | 15,4                            | 25              |                       |                                 |                 | 10                    | 147,6                           | 179             |                       |                                 |                 |
| B.A.           | 57,8                            | 10                   | 19,1                            | 23              |                       |                                 |                 | 10                    |                                 |                 |                       |                                 |                 |
|                |                                 | 5                    | 34,3                            | 59              |                       |                                 |                 | 10                    | 60,7                            | 105             |                       |                                 |                 |
| n=10<br>x<br>s | 57,9<br>± 16,3                  |                      | n=7<br>19,7<br>± 8,6            | 35              |                       |                                 |                 |                       | n=4<br>54,7<br>± 15,4           | 94,4            |                       | n=9<br>77,4<br>± 35,2           | 134             |
| Sign.          | geg. O-Wert                     |                      | p < 0,01                        |                 |                       |                                 |                 |                       | p > 0,5                         |                 |                       | p < 0,5                         |                 |

Tab. 4: 3H - Thymidin - Einbautraten menschl. Knochenmarkzellen vor,  
während und nach HU - Infusion (Methode B, im autologen Serum)  
Meßdaten in nMol 3H - TdR/2 h/ 10<sup>10</sup> Zellen und in % vom O-Wert  
x̄ = Mittelwerte mit Standardabweichung (s), n = 10

| Pat.                   | vor HU (O-Wert)                      |                       | während HU                           |                  |                        | nach HU                              |                 |  |
|------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------|------------------------|--------------------------------------|-----------------|--|
|                        | nMol/2 h/<br>10 <sup>10</sup> Zellen | Std. vor<br>Blockende | nMol/2 h/<br>10 <sup>10</sup> Zellen | % vom<br>O -Wert | Std. nach<br>Blockende | nMol/2 h/<br>10 <sup>10</sup> Zellen | % vom<br>O-Wert |  |
| H.J.                   | 10,93                                | 6                     | 0,32                                 | 3                | 9                      | 12,10                                | 111             |  |
| H.K.                   | 16,50                                | 7                     | 1,16                                 | 7                | 7                      | 12,36                                | 75              |  |
| W.O.                   | 13,39                                | 5,5                   | 1,36                                 | 10               | 10,5                   | 9,45                                 | 71              |  |
| P.A.                   | 14,82                                | 4                     | 3,36                                 | 23               | 14                     | 22,97                                | 155             |  |
| R.R.                   | 12,23                                | 10                    | 1,04                                 | 8                | 10                     | 10,81                                | 88              |  |
| F.W.                   | 22,26                                | 5,5                   | 3,36                                 | 15               | 12,5                   | 34,81                                | 156             |  |
| Ho.M.                  | 29,25                                | 8,5                   | 4,59                                 | 16               | 9,5                    | 25,04                                | 86              |  |
| K.J.                   | 9,77                                 | 5                     | 2,14                                 | 33               | 12                     | 19,80                                | 203             |  |
| N.A.                   | 4,79                                 | 4                     | 2,14                                 | 45               | 11                     | 7,83                                 | 164             |  |
| Hu.M.                  | 13,78                                | 4                     | 3,49                                 | 25               | 11                     | 18,38                                | 133             |  |
| n = 10                 |                                      |                       |                                      |                  |                        |                                      |                 |  |
| x̄                     | 14,77                                |                       | 2,30                                 | 15,6             |                        | 17,35                                | 117,5           |  |
| s                      | ± 6,81                               |                       | ± 1,36                               |                  |                        | ± 8,50                               |                 |  |
| Signifikanz geg.O-Wert |                                      |                       | P < 0,01                             |                  |                        | P > 0,5                              |                 |  |

|                          | vor HU    | unter HU   | nach HU    |             |
|--------------------------|-----------|------------|------------|-------------|
| Patient                  |           |            | 1 - 2 Std. | 7 - 14 Std. |
| K.M.                     | 42,0      | --         | 41,9       | 56,4        |
| D.M.                     | 31,8      | --         | 43,3       | 59,2        |
| H.G.                     | 31,4      | --         | --         | 56,0        |
| St.H.                    | 36,4      | 25,3       | --         | 62,0        |
| P.N.                     | 36,0      | 24,5       | --         | 57,0        |
| T.S.                     | 32,4      | 33,5       | --         | 48,0        |
| W.L.                     | 35,9      | 17,9       | 30,7       | --          |
| Sch.H.                   | 30,7      | 15,2       | --         | 45,6        |
| S.KD.                    | 26,1      | 14,1       | --         | 33,8        |
| H.K.                     | 24,0      | 5,0        | --         | 40,0        |
| W.O.                     | 22,1      | 19,2       | --         | 39,4        |
| P.A.                     | 33,3      | 6,8        | --         | 48,0        |
| n =                      | 12        | 9          | 3          | 11          |
| $\bar{x}$ =              | 31,8      | 17,9       | 38,6       | 49,6        |
| s =                      | $\pm$ 5,6 | $\pm$ 9,0  | $\pm$ 6,9  | $\pm$ 9,3   |
| % vom O-Wert             | --        | 56,3       | 121,4      | 156,0       |
| Signifikanz gegen O-Wert |           | $P < 0,01$ | --         | $P < 0,01$  |

Tab. 5: Autoradiographisch bestimmter 3H - Thymidin - Markierungsindex (MI) der proliferierenden Knochenmarkzellen vor, unter und nach 10-stündiger HU - Infusion (Einzelwerte, Mittelwerte mit Standardabweichung % - Werte vom Ausgangswert, Signifikanz gegen Ausgangswert)

### 5.6. DNS - GEHALT IN DEN ZELLZYKLUSPHASEN (DNS - VERTEILUNGSMUSTER)

Die rechnerische Auswertung der mittels Durchflußzytophotometrie erstellten Histogramme ergibt eine prozentuale Verteilung aller gemessenen kernhaltigen Zellen auf die  $G_0$  und  $G_1$ , auf die S und auf die  $G_2$  und M - Phase. Ausgewertet wurden die Histogramme von 10 Patienten, der Anteil der Zelltrümmer, als Ausdruck letaler Schädigung, war bei allen Messungen recht gering (kleiner als 2-3 %).

Insgesamt ergaben sich keine großen Veränderungen (Abb. 9). Der erwartete Abfall der  $G_1$  - Phase - Zellen nach Aufhebung der HU - Wirkung zugunsten eines Anstiegs der S - Phase - Zellen blieb mit 95 % des Ausgangswertes gänzlich aus. Ebenso zeigte sich kein Anstieg der  $G_1$  - Phase - Zellen während HU (97 % des Ausgangswertes) im Sinne eines Auflaufens vor dem  $G_1$ /S - Block. Die S - Phase - Zellen stiegen während der HU - Applikation auf 117 %, und nach deren Ende auf 129 % vom O - Wert an. Die M - Phase - Zellen stiegen während und 10 Std. nach HU - Gabe auf das 1,33-, bzw. auf das 1,5 - fache des O - Wertes an. Signifikant war lediglich der Anstieg der S - Zellen nach der HU - Applikation ( $P < 0,5$ ).

Da alle im Knochenmarkpunktat enthaltenen kernhaltigen Zellen, also auch proliferationsinaktive Zellen, in diese Messungen einbezogen werden mußten, wurde versuchsweise der aus den Histogrammen gewonnene Anteil an S - Phase - Zellen mit dem morphologisch an den Ausstrichen festgestellten Anteil der proliferierenden Zellen des Knochenmarks in Beziehung gesetzt. Dies ergibt einen korrigierten Anteil an S - Phase - Zellen, der dann insgesamt ca. 2,5 - fach höher ausfällt; d.h. es wären zum Beispiel bei der 3. Punktion (ca. 10 Stunden nach HU - Wirkungsende) statt 13,5 % nun 34,8 % S - Phase - Zellen anzunehmen (Tab. 6).

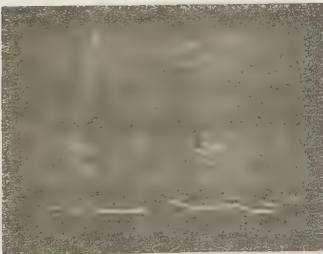
Die Tendenz der Werte während und nach HU - Inhibition bleibt mit einem Anstieg auf 132 % während und 153 % nach HU jedoch



## 1. Punction

 $32 \% G_0 + G_1$ 
 $14 \% S$ 
 $4 \% G_2 + M$ 


## 2. Punction

 $81 \% G_0 + G_1$ 
 $15 \% S$ 
 $4 \% G_2 + M$ 


## 3. Punction

 $68.5 \% G_0 + G_1$ 
 $27 \% S$ 
 $4.5 \% G_2 + M$ 

Abb. 9: Originalphotographien von DNS - Histogrammen eines Patienten vor, während und nach HU - Einwirkung mit rechnerischer Auswertung (in Prozent aller kernhaltigen Zellen)

genau die gleiche. Auch hier ist nur der S - Anstieg nach "Blockende" signifikant gegenüber dem S - Prozentsatz vor der Behandlung.

#### 5.7. AKTIVITÄTSRATE DER S - PHASE - ZELLEN

Setzt man die liquidszintimetrisch gemessenen Werte des 3H - TdR - Einbaus in die DNS direkt in Beziehung zum zytophotometrisch bestimmten Anteil der S - Phase - Zellen, erhält man ein Maß für die DNS - Synthese - Aktivität der einzelnen S - Phase - Zellen. Ein solcher, bei 8 Patienten, deren Einbau-raten mit der gleichen Methode im autologen Serum bestimmt wurden, vorgenommener Vergleich ergibt als Ausgangswert eine Aktivitätsrate von durchschnittlich  $180 \pm 63$ . Unter HU - Einfluß sinkt die Aktivität der einbauenden Zellen um 83 % auf eine Rate von  $30 \pm 22$ . Im Zeitraum 7 - 14 Stunden nach Unterschreiten der minimalen HU - Hemmkonzentration von  $1,5 \times 10^{-4} M$  liegt die Aktivitätsrate im Schnitt wieder beim Ausgangswert,  $\bar{x} = 190 \pm 124$ . Es zeigt sich dabei, daß 5 von den 8 Patienten die Ausgangs - Aktivität nicht wieder erreichen. Bei 3 Patienten steigt der 3H - TdR - Einbau pro S - Phase - Zelle nach HU aber um 50 % (Abb. 10, Tab. 7).

#### 5.8. MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IM KNOCHENMARK

Bei 11 Patienten war es möglich, eine morphologische Knochenmarkdifferenzierung anhand von Ausstrichen vor, während und nach HU vorzunehmen.

Innerhalb der myeloischen Reihe verteilten sich die Zellen im Kontrollausstrich im Schnitt wie folgt: 23,5 % im Proliferationspool, 38,5 % im Reifungspool und 18 % periphere segmentierte Granulozyten. Sowohl die während der 10-stündigen HU - Infusion, als auch die circa 24 Stunden nach Beginn der HU - Gabe, wenn keine HU - Wirkung mehr vorlag, festgestellten Verteilungen unterschieden sich nicht wesentlich voneinander (Tab.9).

Insgesamt kommt es zu einer leichten Rechtsverschiebung, mit einer Abnahme des Proliferationspools um 15 %, einer entsprechenden Zunahme des Reifungsspeichers um 20 % und des Anteils der peripheren segmentkernigen Granulozyten um 17 % gegenüber dem Kontrollwert. Eine direkte, eventuell selektive letale Wirkung von HU auf die verschiedenen Kompartimente der weißen Entwicklungsreihe des Knochenmarks ist innerhalb unseres Untersuchungszeitraums nicht erkennbar ( Abb. 11).

Beim Vergleich der proliferierenden Zellen der myeloischen Reihe mit denen der erythropoetischen Reihe, dem M/E - Quotient, ergibt sich keine Veränderung, die auf die Wirkung von HU zurückgeführt werden müßte. Auch hier gibt es keine selektive Letalität (Tab. 9).

| Zellen in Zyklusphase             | vor HU ( % )      | unter HU ( % )    | nach HU ( % )     |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| G <sub>0</sub> und G <sub>1</sub> | 87,8 $\pm$ 6,6    | 85,3 $\pm$ 7,5    | 83,3 $\pm$ 10,2   |
| S                                 | 10,5 $\pm$ 6,4    | 12,3 $\pm$ 6,7    | 13,5 $\pm$ 8,6    |
| (S korrigiert)                    | (22,7 $\pm$ 14,3) | (29,9 $\pm$ 20,2) | (34,8 $\pm$ 20,0) |
| G <sub>2</sub> und M              | 1,8 $\pm$ 1,1     | 2,4 $\pm$ 1,2     | 2,7 $\pm$ 2,1     |

Tab. 6: Verteilung mononuklearer Knochenmarkszellen auf die Zellzyklusphasen vor, unter und nach HU - Infusion bei 10 Patienten ( Mittelwerte mit Standardabweichungen)

|                            | vor HU        | unter HU      | nach HU       |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Aktivitätsrate             | 1,8 $\pm$ 0,6 | 0,3 $\pm$ 0,2 | 1,9 $\pm$ 1,2 |
| % vom O-Wert               | ---           | 17            | 105           |
| Signifikanz gegen O - Wert |               | P 0,01        | P 0,5         |

Tab. 7: Aktivitätsrate der S - Phase - Zellen (nMol 3H - TdR/ 2h/ 10<sup>10</sup> Zellen pro % S - Phase - Zellen) vor, unter und nach HU - Infusion bei 8 Patienten (Mittelwerte mit Standardabweichungen, % - Werte vom Ausgangswert und Signifikanz gegen Ausgangswert)

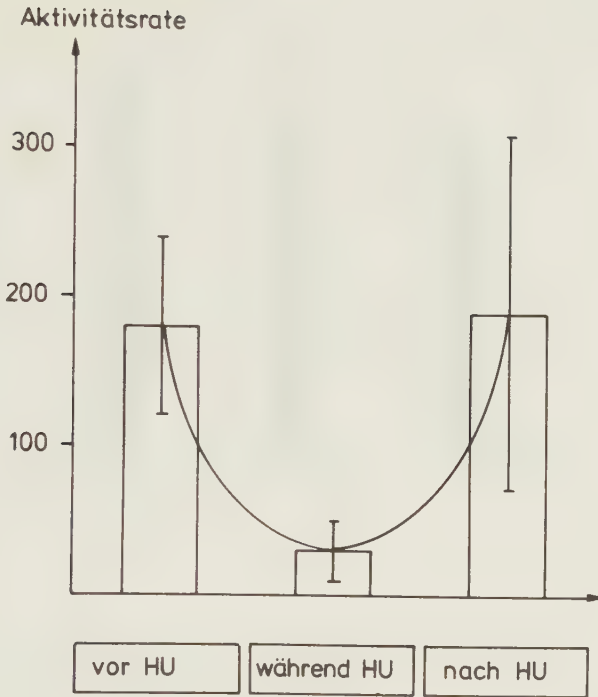


Abb. 10: Aktivitätsrate (3H - TdR - Einbau pro S - Phase - Zelle) vor, während und nach HU - Infusion (Mittelwerte mit Standardabweichung,  $n = 8$ ).

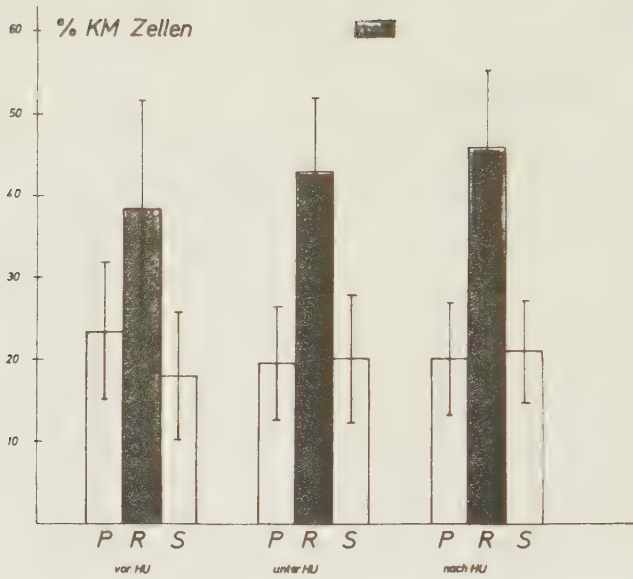


Abb. 11: Morphologische Kompartimente von Knochenmarkzellen und ihre Veränderung durch HU - Einwirkung bei 11 Patienten. (P = Proliferationspool, R = Reifungspool, S = periphere segmentierte Granulozyten)

|          |                 | Knochenmarkdifferenzierung                |                                        |                                         |
|----------|-----------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
|          | M/E-Quotient    | Zellen des<br>Prolifera-<br>tionspools(%) | Zellen des<br>Reifungs-<br>pools ( % ) | Zellen des<br>peripheren<br>Pools ( % ) |
| vor HU   | $1,2 \pm 0,65$  | $23,5 \pm 8,5$                            | $38,5 \pm 13,3$                        | $18,0 \pm 8,0$                          |
| unter HU | $1,25 \pm 0,85$ | $19,5 \pm 6,9$                            | $43,0 \pm 9,1$                         | $20,0 \pm 7,9$                          |
| nach HU  | $1,1 \pm 0,35$  | $20,0 \pm 6,9$                            | $46,0 \pm 9,4$                         | $21,0 \pm 6,4$                          |

Tab. 9: Morphologische Veränderungen im Knochenmark während und nach 10-stündiger HU - Infusion (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 11)

### 5.9. WACHSTUM DER GRANULOPOETISCH DETERMINIERTEN STAMMZELLEN (CFU - C)

Die Wirkung von HU auf die Stammzellen des normalen menschlichen Knochenmarks wurde bei den letzten 5 Patienten, zusätzlich zu den anderen Untersuchungen, geprüft.

Gemessen wurde das Wachstum der granulopoetisch determinierten Stammzellen (CFUc) unter Normalbedingungen, während der HU - Infusion und bis zu 14 Stunden nach Ende des HU - "Blocks". Bezogen auf  $1 \times 10^5$  eingesetzte, aus dem Knochenmarkpunktat stammende mononukleare Zellen, wuchsen im Schnitt 33 Kolonien ( $s = \pm 20,5$ ). Dabei ergab sich ein sehr unterschiedliches Bild. Während bei 3 Patienten die Zahl der Kolonien unter HU auf 173 % des 0 - Wertes anstiegen, zeigte sich bei 2 Patienten eine Reduktion der Stammzell - Kolonien auf 51 %, bzw. 26 % der Vorwerte. Nach Ende der HU - Wirkung lagen die Werte der 3 Patienten mit der Erhöhung unter HU genau auf der Ebene der Ausgangswerte ( $\bar{x} = 101$  %). Bei dem Patienten mit der Reduktion auf die Hälfte stellte sich 12 Stunden nach Aufhebung des HU - "Blocks" eine Erhöhung der Stammzell - Proliferation auf das Doppelte des Ausgangswertes ein. Die Patienten mit der Erniedrigung auf ein Viertel erreichte mit 70 % des Ausgangswertes den vorherigen Stand nicht mehr (Abb. 12).

### 5.10. PERIPHERES BLUTBILD NACH HU - INFUSION

Zur weiteren Überprüfung der Toxizität von Hydroxyurea wurde neben den klinischen Erscheinungen auf das Verhalten der peripheren Blutzellen, insbesondere der Leukozyten geachtet. Aus den routinemäßig auf den Stationen durchgeführten Blutbildkontrollen wurden für alle 20 Patienten die Ausgangswerte vor der HU - Behandlung zusammengestellt. Am 1. Tag nach HU, sowie alle weiteren zwei Tage wurden die Blutbilder wieder kontrolliert. Mit der Zeit war dies bei zunehmend weniger Patienten möglich, da diese entweder mit Zytostatika weiterbehandelt, verlegt oder entlassen wurden.

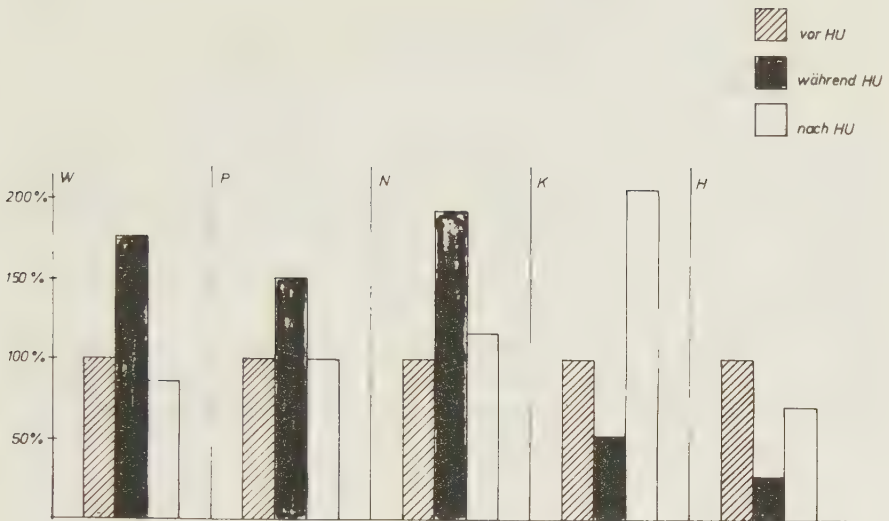


Abb. 12: Zahl der CFU - C in Prozent vom Ausgangswert (vor HU) während und nach 10-stündiger HU - Infusion  
Einzeldarstellungen von 5 Patienten

Während der 10-stündigen peroralen HU - Infusion zeigte sich in 2 von 20 Fällen leichte Übelkeit, die durch einmalige Gabe von Metoclopramid - Tropfen behoben werden konnte, so daß eine Unterbrechung der Behandlung nicht erwogen werden mußte. Weitere klinische Zeichen von Toxizität traten weder während, noch nach der HU - Gabe auf.

24 Stunden nach der HU - Behandlung war bei 13 auswertbaren Patienten mit gesundem Knochenmark keine statistisch signifikante Veränderung der peripheren Leukozytenzahlen zu erfassen, ( $P > 0,5$ ), im Gegensatz zu den stark erniedrigten Werten bei Patienten mit myeloischer Leukämie nach einmaliger Gabe einer sehr ähnlichen Dosis HU (77) (Tab. 8).

Es zeigte sich ferner, daß weder in den ersten Tagen nach HU - Gabe, noch in der Zeit bis zu 4 Wochen nachher ein deutliches Abfallen der Leukozyten, Erythrozyten oder Thrombozyten eintritt. (Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15).

|         | Leukoz.vor HU                            | Leukozyten 24 Std.nach HU               |                        |
|---------|------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| Patient | absol.Zellzahl<br>Zellen/mm <sup>3</sup> | absol. Zellz.<br>Zellen/mm <sup>3</sup> | Zellzahl<br>% v.O-Wert |
| B.E.    | 4.800                                    | 6.600                                   | 138                    |
| S.M.    | 7.200                                    | 8.100                                   | 113                    |
| Sch.H.  | 8.600                                    | 7.800                                   | 91                     |
| T.S.    | 8.100                                    | 8.800                                   | 109                    |
| P.N.    | 6.200                                    | 5.000                                   | 81                     |
| H.G.    | 5.300                                    | 5.700                                   | 108                    |
| D.M.    | 6.500                                    | 5.500                                   | 85                     |
| S.KD.   | 4.900                                    | 4.400                                   | 90                     |
| H.K.    | 17.200                                   | 13.700                                  | 77                     |
| W.O.    | 14.700                                   | 12.500                                  | 85                     |
| P.A.    | 6.700                                    | 5.600                                   | 84                     |
| R.R.    | 5.200                                    | 5.000                                   | 96                     |
| F.W.    | 9.000                                    | 7.900                                   | 88                     |
| n = 13  | $\bar{x} = 8.000$<br>$s = \pm 3.800$     | $\bar{x} = 7.400$<br>$s = \pm 2.900$    | 93                     |

Tab. 8: Anzahl der Leukozyten im Blut 24 Stunden nach HU  
(Einzelwerte, n = 13, Mittelwerte mit Standardabweichung, sowie % - Werte vom Ausgangswert)

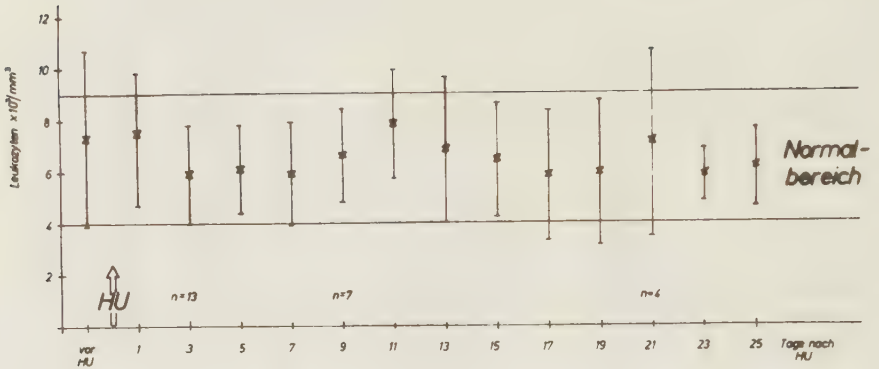


Abb. 13: Periphere Leukozyten vor und bis zu 4 Wochen nach HU - Infusion (Mittelwerte mit Standardabweichung)

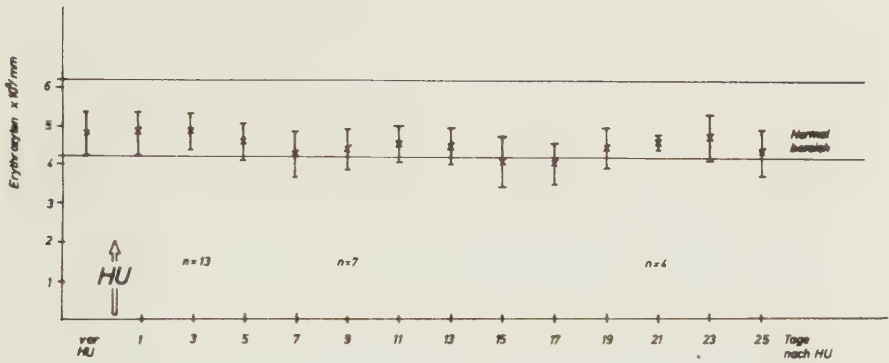


Abb. 14: Periphere Erythrozyten vor und bis zu 4 Wochen nach HU - Infusion (Mittelwerte mit Standardabweichung)

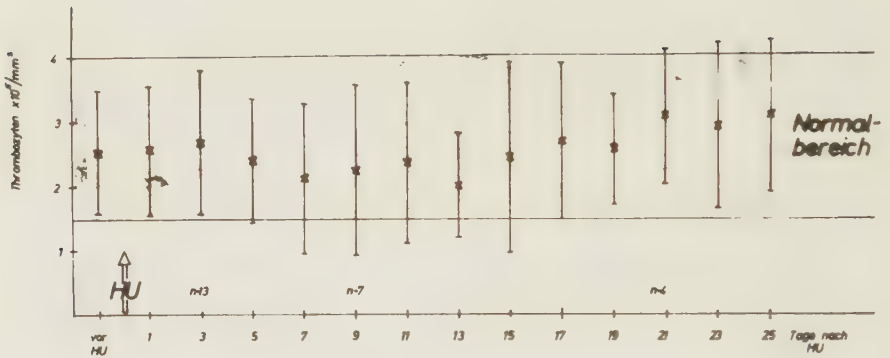


Abb. 15: Periphere Thrombozyten vor und bis zu 4 Wochen nach HU - Infusion (Mittelwerte mit Standardabweichung)

## 6. DISKUSSION

Hydroxyurea spielt als Zytostatikum in der Therapie menschlicher Tumorerkrankungen nur eine untergeordnete Rolle (104). Das Hauptanwendungsgebiet der Substanz liegt im Bereich proliferationskinetischer Untersuchungen, in den letzten 10 Jahren vor allem mit der Fragestellung der "Synchronisierbarkeit" von Zellen.

Durch seine S - Phasen - spezifische Wirkung eignet sich HU ferner zur Bestimmung der Größe des DNS - synthetisierenden Anteils von Zellpopulationen. Neben der als Standardverfahren eingesetzten "Thymidine suicide technique" zur Ermittlung des proliferativen Status tierischer und menschlicher Knochenmarkstammzellen (65,101) verwendet man die Sensivität der Stammzellen gegenüber dem in der S - Phase letal dosierten HU als Index für den DNS - reduplizierenden Prozentsatz dieses morphologisch nicht faßbaren Knochenmarkskompartmentes (73, 101, 103).

Die Praktikabilität des Prinzips der "Synchronisation" unter Verwendung von HU wurde in vielen experimentellen Untersuchungen belegt. Als Modelle wurden Zellkulturen (77, 90, 107, 130, 131), solide und liquide experimentelle Tiertumore (16, 42, 68, 78, 91, 112, 121, 125), Normalgewebe von Tieren (15, 16, 35, 46, 69, 91, 97, 108, 116) oder akute myeloische Leukämien des Menschen (126, 127) verwendet. Bei soliden menschlichen Tumoren bewirkte HU keinerlei (38) oder nur geringfügige "Zellsynchronisation" (4). Zudem zeigten sich unerwünschte und deutliche zytozide Effekte (4, 99, 126).

Aufbauend auf den vorliegenden Befunden eröffnete sich jedoch die Frage nach einer gezielten Wachstumsmodifikation menschlicher Zellen in vivo, die wir am Beispiel des Knochenmarks und unter Verwendung einer modifizierten Applikationsform von Hydroxyurea untersuchten.

Dosis - Wirkungskurven von HU liegen weder für menschliches Knochenmark, noch für menschliche Tumore vor. Aufgrund der

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für den DNS - Einbau in myeloisch - leukämische Zellen in Höhe von  $1,5 \pm 0,6 \times 10^{-4}$  M HU im Blut einerseits und bei malignen Zellen bereits bei  $11,0 \pm 2,1 \times 10^{-4}$  M auftretenden zytoziden Effekten (99) konnte eine nicht - toxische Hemmkonzentration im dazwischenliegenden Bereich angenommen werden. BELT et al. (4) bestätigten diese Überlegung durch die Beobachtung, daß HU - Blutspiegel von mehr als  $1 \times 10^{-3}$  M zur Myelosuppression bei ihren Patienten führten, und durch die Wahl eines Blutspiegel - Niveaus von  $10^{-4}$  M für ihre pharmakokinetischen und synchronisierenden Untersuchungen.

In vivo erstellte Dosis - Wirkungskurven von HU an L 1210 Leukämiezellen von Mäusen beweisen eine deutliche Dosisabhängigkeit der HU - Wirkung im Spektrum von "keinerlei Wirkung" (1 mg/kg/h über 24 h) über einen Rückgang der DNS - Synthese (48 mg/kg/h über 24 h) bis zu einer ausgeprägten Zytotoxizität (96 mg/kg/h über 24 h) (72).

Die Konzentrationsabhängigkeit der toxischen Effekte wurde auch schon in früheren Arbeiten belegt (30, 51, 78, 80, 87, 106). Bei einem Vergleich der zytotoxischen Wirkung von HU auf das Yoshida - Aszites - Sarkom und das normale Knochenmark der Ratte zeigte sich eine wesentlich deutlichere Empfindlichkeit des Knochenmarks, da bei einer HU - Konzentration von  $2,2 \times 10^{-3}$  M die Zellverlustrate beim Sarkom Null war, beim Knochenmark jedoch als geringsten Wert 30 % ausmachte (78). RAJEWSKI (91) berichtet über eine außerordentliche Sensibilität lymphatischer Zellen von Ratten, PELKA (77) erreichte mit  $5 \times 10^{-4}$  M und  $1 \times 10^{-3}$  M eine Teilsynchronisation an zwei verschiedenen menschlichen Lymphoblastenkulturen bei geringer Zytotoxizität.

Wichtig war die Tatsache, daß sich im Blutspiegelbereich von  $0,5 - 1 \times 10^{-3}$  M bei Patienten mit normalem Knochenmark innerhalb von 4 Wochen keine Veränderung der peripheren Blutzellen ergab. Bei einer Dosierung um  $5 \times 10^{-4}$  M gelang, gemessen am 3H - TdR - Einbau, eine "Partialsynchronisation" des menschlichen Knochenmarks in vivo (38).

Auf den bei einer neueren Untersuchung bekanntgegebenen starken Abfall der peripheren Leukozyten und Thrombozyten bei HU-Blutspiegeln über  $1 \times 10^{-3}$  M und den relativ besten Grad an "Synchronisierbarkeit" menschlicher Knochenmarkszellen bei  $5 \times 10^{-4}$  M sei nochmals hingewiesen (4).

Um das Blutspiegel - Niveau von  $5 \times 10^{-4}$  M zu erreichen, gaben wir 25 mg/kg KG als Bolus in den Magenschlauch. Die eine Stunde danach gemessenen Blutkonzentrationen lagen bei  $5,25 \pm 1,1 \times 10^{-4}$  M HU. Zur Aufrechterhaltung dieses Spiegels genügte die kontinuierliche Zufuhr von 5 mg/kg KG pro Stunde.

Sehr ähnliche Mengen HU werden in der nach Abschluß unserer Untersuchungen erscheinenden Arbeit von BELT et al. (4) genannt: 400 - 800 mg HU/m<sup>2</sup> Körperoberfläche alle 4 Stunden bei oraler Zufuhr (entsprechend circa 10 - 20 mg/kg KG) und 200 - 540 mg/m<sup>2</sup> (5 - 15 mg/kg) als Push und 2 - 3,5 mg/m<sup>2</sup>/Minute (3 - 6 mg/kg/ Stunde) bei intravenöser Gabe. Die bei Tierversuchen zur Synchronisation von soliden Tumoren, Aszitestumoren oder von Knochenmarkstammzellen (46) gebrauchten Mengen liegen minimal um den Faktor 10 (72) und maximal um den Faktor 100 (16) höher!

Die Wirkung von HU ist aber nicht nur von der Dosierung abhängig - über die Mechanismen der DNS - Reduplikations - Inhibition oder auch direkter Angriffe auf die DNS (122) - sondern, wahrscheinlich über den Vorgang des "unbalanced growth" (74) auch von der Expositionszeit gegenüber dem Medikament (72).

Im folgenden soll nun die von uns gewählte HU - Einwirkdauer (15 Std. bis zum Unterschreiten der minimalen Hemmkonzentration) begründet werden. Aufgrund tierexperimenteller und theoretischer Erkenntnisse sollte die Einwirkdauer des Medikaments die Generationszeit der Zellen nicht überschreiten (106), wobei eine Dauer von  $T_C$  minus  $T_S$  einen höheren Grad an "Synchronisation" bei Vermeidung von stärkerer Zellschädigung ergab (38, 91).

Daraus geht hervor, daß für derartige proliferationskinetische Untersuchungen die Kenntnis der Zellzyklus - Parameter, speziell der Dauer der Zellzyklusphasen, notwendig ist. Die oft zur Bestimmung verwendete Prozent - Markierte - Mitosen - Kurve erweist sich dabei allein schon wegen der notwendigen in - vivo Anwendung

von 3H - Thymidin bei menschlichen Tumor- und Normalgeweben als nicht praktikabel (38). Erst die später entwickelten autoradiographischen in - vitro - Methoden der 14C - Thymidin und 3H - Thymidin - Doppelmarkierung, sowie die quantitative 14C - Autoradiographie mit auflichtphotometrischer Messung erlauben Analysen an Einzelzellen (7).

Beim Knochenmark gilt es zudem zu berücksichtigen, daß es sich um ein Gewebe mit sehr heterogenen Zellpopulationen handelt. Nicht nur das rote und weiße Zellsystem, sondern die ganze Entwicklungsreihe von den Stammzellen bis zu den Zellen im Reifungspool haben unterschiedliche Zellkinetiken. Für die Gesamtpopulation der Erythroblasten vorgenommene Bestimmungen (20) zeigen eine mittlere Generationszeit ( $T_C$ ) zwischen 22,5 und 33 Stunden bei einer mittleren DNS - Synthesezeit ( $T_S$ ) von 9,6 bis 10,1 Stunden. Die S - Phasen - Dauer der Gesamtpopulation der myeloischen Vorstufen schwankt zwischen 9,0 und 10,1 Stunden, die Generationszeit zwischen 26,5 und 30 Stunden. DÖRMER und BRINKMANN (21) bestimmten bei 5 Personen mit normaler Myelopoese die DNS - Synthese - Dauer von Myeloblasten mit  $13,2 \pm 1,8$  Std., von Promyelozyten mit  $13,4 \pm 0,9$  Std. und von Myelozyten mit  $14,1 \pm 1,1$  Stunden. Mit diesen Werten, sowie mit der Häufigkeit der Zellen in den morphologischen Kompartments und mit dem 3H - TdR - Markierungsindex können die übrigen Parameter, so die Generationszeit, errechnet werden. Diese beträgt für Myeloblasten  $18,4 \pm 2,8$  Std., für Promyelozyten  $19,3 \pm 2,5$  Std. und für Myelozyten  $54,4 \pm 11,1$  Stunden. In weiteren Untersuchungen (20) ermittelte Zeiten für die roten Vorstufen lauten (jeweils  $T_S$  und  $T_C$ ): Proerythroblasten  $9,4 \pm 1,9$  und  $12,7 \pm 2,7$ , basophile Erythroblasten  $11,0 \pm 2,3$  und  $16,1 \pm 3,2$  und polychromatische Erythroblasten  $17,0 \pm 3,4$  und  $35,4 \pm 7,9$  Stunden. Nach den vorliegenden Daten entschieden wir uns für eine HU - Einwirkdauer zur DNS - Inhibition von 12 - 20 Stunden.

Durch eine orale Dauerinfusion von HU über 10 Stunden auf dem Blutniveau von  $5 \times 10^{-4}$  M erreichten wir, entsprechend der ermittelten Abfallkinetik von HU beim Menschen mit einer Halb-

wertszeit von  $3,3 \pm 1,15$  Stunden, eine durchschnittliche "Blockdauer" von  $15,4 \pm 1,75$  Stunden. Damit wurde die Forderung erfüllt, mit der DNS - Stoffwechsel - Blockierung die Dauer eines Zellzyklus nicht zu überschreiten. Eine Ausnahme bilden nur die Proerythroblasten, deren  $T_C$  um circa 2,5 Stunden übertroffen wird. Rein mengenmäßig stellt diese Population mit einer relativen Häufigkeit von 3 % (20) einen geringen Anteil der Zellen des Knochenmarks dar. Nimmt man nach BEGEMANN (3) die mittlere Generationszeit der teilungsfähigen roten Vorstufen mit ca. 24 Stunden an und die der proliferierenden weißen Vorstufen mit 24 - 48 Stunden, bei einer auch zwischen den Zellsystemen relativ konstanten S - Periode von 6 - 12 Std., so liegen die erreichten 15,4 Stunden Blockierung insgesamt im Bereich der erwünschten Blockdauer von  $T_C$  minus  $T_S$ .

Zur Bedeutung der "mittleren Generationszeit" sind aber kritische Anmerkungen angebracht. Definiert man nämlich eine gewebespezifische Zellzykluszeit, kann man keinesfalls voraussetzen, daß alle Zellen dieses Gewebes den gleichen, immer regelmäßigen Zykluszeiten unterworfen sind, d.h. sukzessive Teilungen in konstanten Zeitintervallen erfolgen (45). Obwohl das Knochenmark, das ein Gewebe mit großer Proliferationsrate und mit relativ kurzer Generationszeit ist, wahrscheinlich geringere individuelle Variabilität der Zellen innerhalb derselben Population aufweist wie fast alle soliden Tumore, erschwert seine große Heterogenität noch zusätzlich die Festlegung einer allen Bedingungen entsprechenden optimalen Einwirkdauer von Medikamenten.

Entsprechend diesen typischen Variablen eines biologischen Versuchsansatzes gestaltet sich die gezielte Beeinflussung proliferationskinetischer Parameter der Zellen als äußerst schwierig.

Da Hydroxyurea nur in oraler Verabreichungsform zur Verfügung steht, wählten wir, um während der HU - Gabe über 10 Stunden einen möglichst gleichmäßigen Blutspiegel zu erhalten, als Applikationsform die orale Dauerinfusion via Nasen - Magensonde. Bei der fraktionierten oralen Gabe sind große Unterschiede und Schwankungen beschrieben, die sich in kurzzeitigen Konzentrationsspitzen mit allgemein toxischer Reaktion wie Übelkeit

und Erbrechen (38), sowie in einer schlecht steuerbaren Kumulationsneigung (4) manifestieren. Auch bei Tierversuchen werden oftmals kontinuierliche Infusionen bevorzugt (42, 72, 78, 87). Zeichen einer lokalen Schleimhautschädigung traten bei oraler oder intravenöser Dauerverabreichung weder während, noch nach den Infusionen auf. Der gleichmäßige Verlauf, den die Blutspiegelkurve bei unseren Patienten zeigt (Abb.7), wurde auch von anderen Untersuchern (4) bei Dauerinfusion beobachtet.

Die Halbwertszeit war nach der 10 - stündigen Infusion mit  $200 \pm 95$  Minuten länger als nach einmaliger Gabe von 100 mg/kg KG, wo nur 100 Minuten gemessen wurden (91) oder nach einmaliger Gabe von 50 mg/kg/KG mit einer HWZ von  $155 \pm 30$  Minuten (99), obwohl die Ausgangskonzentration in der 10. Stunde mit durchschnittlich  $4,75 \pm 1,15 \times 10^{-4}$  M HU um die Hälfte niedriger lag, als nach der einmaligen Gabe mit  $11 \pm 2,1 \times 10^{-4}$  M (99). BELT et al. (4) berichten nach Ende einer HU - Infusion mit Blutspiegeln zwischen  $4,6$  und  $10,9 \times 10^{-4}$  M über Halbwertszeiten zwischen 220 und 267 Minuten, während sich nach fraktionierter oraler Gabe große Unterschiede in den Halbwertszeiten ergaben, die von 132 bis 279 Minuten reichten. Die im Vergleich zur intravenösen Gabe größere Schwankungsbreite wird auf individuelle intestinale Resorption zurückgeführt (4), sowie auf Unterschiede im HU - Metabolismus, vor allem in der Leber.

Eine Korrelation von längeren HWZ mit pathologischen Leberenzymwerten und damit eine Vorhersage über das Auftreten von HWZ - Verlängerungen bei vorbestehendem Leberschaden war bei unseren Patienten aber nicht gegeben. RAJEWSKI et al. (91) beschreiben nach 2/3 - Hepatektomie bei Ratten eine Verlängerung der HWZ im Blut um den Faktor 2,8. Bei einem unserer Patienten, der erst nach unserer Untersuchung verifizierte Lebermetastasen eines Adenocarcinoms des Colon hatte, zeigte sich eine Verlängerung der HWZ gegenüber dem Schnitt von 19 Patienten um den Faktor 2,5.

Insgesamt zeigen unsere Patienten längere HWZ im Vergleich zu den Halbwertszeiten nach einmaliger Gabe von HU (91, 99). Die von BELT et al. (4) mit ähnlicher Dosis durchgeführten Infusionen erbrachten nach 72 - stündiger Dauergabe unseren Werten gut vergleichbare Halbwertszeiten. Bei wiederholter Einzelanwendung von HU im Abstand von einer Woche blieb die individuelle Eliminationsgeschwindigkeit gleich (99). Nach mehrstündiger Dauergabe könnte also eine fortlaufende Rückdiffusion von HU aus Geweben mit höherer Anreicherung zur Erklärung der großen HWZ - Unterschiede herangezogen werden, obwohl RAJEWSKI die im Blut gemessenen Konzentrationen bei Ratten auch für (Tumor-) Gewebe als repräsentativ bezeichnet (91). Neben diesen Verteilungsunterschieden sind aber auch unterschiedliche Resorption oder unterschiedliche Effektivität des enzymatischen HU - Katabolismus (11) zu bedenken.

Von uns vorgenommene vergleichende Messungen der HU - Konzentration im Venenblut und im Knochenmarkpunktat bei 14 Patienten lieferten oft identische Werte und zeigten im Schnitt keinen signifikanten Unterschied, was auch für den Vergleich Blut und Pleurapunktat gilt (4).

Der Einfluß des HU - Wirkspiegels auf das Knochenmark in vivo wurde unter dem proliferationskinetischen Aspekt mit den Methoden der Liquidszintillationszählung des in die DNS eingebauten 3H - Thymidins, der Zählung der 3H - TdR - markierten Zellen im Autoradiogramm und der Bestimmung des DNS- Gehalts der Zellen in der Durchflußzytometrie gemessen.

Die Einbauraten wurden bei jeweils 10 Patienten mit zwei verschiedenen Methoden der Inkubation und Aufbereitung bestimmt. Methode A (gewaschene und in Medium resuspendierte KM - Zellen) und Methode B (im autologen Serum inkubierte Zellen) zeigten die gleiche Tendenz, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung (Abb.8). So war bei Methode A während der HU - Applikation ein signifikanter Abfall der DNS - Einbauraten auf 35 % vom Ausgangswert. Dem folgte ein Anstieg auf 93 % bereits 1 bis 2 Stunden

nach Ende der DNS - Inhibition, also dem Unterschreiten der minimalen Hemmkonzentration. 7 bis 16,5 Stunden danach trat ein signifikantes Überschießen der Einbauraten auf durchschnittlich 134 % auf, wobei Einzelwerte bis 191 % erreicht wurden.

Die gleiche wellenförmige Bewegung wurde unter Methode B beobachtet, mit einem noch stärkeren Abfall der DNS - Synthese unter HU auf 18,5 % vom Ausgangswert. Hier liegen keine Werte über die Zeit kurz nach Ende der DNS - Inhibition vor. Der Anstieg auf 124 % ist geringer und statistisch nicht signifikant, jedoch mit Spitzenwerten bis 203 %. Auch PELKA (77) berichtet über eine deutlichere Hemmung des Einbaus in periphere leukämische Leukozyten unter HU bei nichtgewaschenen Zellen und über einen ebenso geringeren und verzögerten Anstieg nach HU.

Die Reduktion der Einbauraten während der HU - Exposition um nur 2/3 auf 35 % bei Methode A schien uns vor allem methodisch bedingt. So reichte das bei der Methode A notwendige Hämolysieren und mehrmalige Auswaschen der Zellen - verbunden möglicherweise mit dem Auswaschen des HU - sowie das Resuspendieren und die 2 - stündige Inkubation in einer HU - freien Nährlösung wohl aus, um die DNS - Sythese wieder in Gang zu setzen.

Bei Methode B wurde auf das Hämolysieren und Waschen verzichtet und die Inkubation erfolgte im autologen, wie in vivo HU - enthaltenden Serum. Die Reduktion der Einbauraten war tatsächlich signifikant stärker als bei Methode A ( $P < 5$  im U - Test).

Der Vergleich der Wiederanstiege nach HU ergab mit  $P > 10$  (U - Test) jedoch keine statistischen Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Dies war auch zu erwarten, da zu diesen Zeitpunkten auch im autologen Serum keine über der MHK gelegenen HU - Konzentrationen mehr vorlagen. Ein Einfluß der Aufbereitungsmethodik auf den 3H - Einbau in die DNS ist also für die Messungen unter HU zu bejahen, für die Messungen nach HU aber nicht anzunehmen.

Während aber bei den ersten 10 Patienten ein signifikanter Anstieg der Einbauraten nach HU gegenüber den Ausgangswerten

zu verzeichnen ist, gemessen mit Methode A, ist der mit Methode B bei den nächsten 10 Patienten gemessene Anstieg nicht statistisch sicherbar. 4 Patienten erreichten nicht ihren Ausgangswert.

Als Erklärungsversuch könnte man annehmen, daß im autologen Serum und intrazellulär bei Methode B doch noch eine hemmwirksame Konzentration von HU oder einem Metaboliten vorgelegen haben muß, da unsere angenommene minimale Hemmkonzentration von  $1,5 \times 10^{-4}$  M nur den Mittelwert der von SAUER et al. (99) vorgenommenen Bestimmungen darstellt. Eigene in vivo - Messungen der MHK für Knochenmark wurden nicht durchgeführt. Eine Aufhebung der HU - Wirkungen unter  $1 \times 10^{-4}$  M wird allerdings auch von anderen Autoren beschrieben (4).

Unter Umständen muß also doch auch nach HU mit einem Einfluß der Inkubations- und Aufbereitungsmethode auf den DNS- Einbau gerechnet werden.

Ein anderer Ansatzpunkt ist die Beobachtung, daß bei den 4 Patienten die DNS - Inhibition, gemessen am 3H - Einbau nicht nur fast doppelt intensiver war als im Schnitt (Reduktion auf 10 % im Vergleich zu 18,5 %), sondern auch die Blockdauer um 2,4 Stunden deutlich länger war, als im Gesamtdurchschnitt (17,8 Std. im Vergleich zu 15,4 Std.). Auch die von 2 Patienten vorliegenden Autoradiogramme zeigen eine relativ zum Gesamtkollektiv starke Verringerung der markierten Zellen während HU. Da aber keine Abnahme der S - Phase - Zellen im Histogramm sichtbar ist, handelt es sich um eine besonders starke Aktivitätsminderung der DNS - Synthese, die durch unsere autoradiographische Methode nicht erfaßt werden konnte.

Bei diesen Patienten war die DNS - Inhibition durch HU eindeutig ausgeprägter als im Schnitt. Inwieweit diese Tatsache, eventuell Ausdruck einer toxischen Wirkung auf einen Prozentsatz der S - Phase - Zellen, das Nichterreichen der Ausgangs - Einbauraten und der Ausgangs - Aktivitätsraten beeinflußt, läßt sich jedoch zum Zeitpunkt unserer Untersuchung, 7 bis 10,5 Stunden nach HU - "Blockende", nicht klarstellen.

Eine wesentliche Steigerung der Einbauraten im Sinne einer relevanten "Zellsynchronisation", wie früher berichtet (38), konnte in unserer Untersuchung nicht festgestellt werden. Auch andere Autoren hatten über starke, überschießende Anstiege der DNS - Synthese um circa das dreifache berichtet, allerdings bei peripheren Leukozyten eines an AML erkrankten Patienten (99). Ein deutlicher Synchronisationseffekt mit einem zweiten DNS - Synthesegipfel ist von einer menschlichen Lymphoblasten - Dauerkultur in vitro beschrieben (77). Bei Untersuchungen am soliden Walker - Carcinosarkom und am soliden Neurosarkom von Ratten zeigten sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse (121). Bei allen diesen Versuchen ergab sich aber unter HU eine fast vollständige Einbauhemmung, im Gegensatz zu unseren Untersuchungen, bei denen die Einbauhemmung nie zum völligen Stoppen der DNS - Synthese führte.

Obwohl sich die in vitro und tierexperimentell ermittelten Daten, allein schon wegen anderer Versuchsanordnungen und anderer Dosierungen schlecht vergleichen lassen, ist die gleiche Tendenz der Wirkung von HU mit der Einbauratenmessung bei vielen proliferierenden Geweben nachweisbar.

Zur Methode der Liquidszintillationszählung gilt es zu bedenken, daß mit ihr, ohne Berücksichtigung der Morphologie, der  $^3\text{H}$  - Einbau in alle Zellen eines geprüften Gewebes gemessen wird, gleich ob es sich, wie bei jedem Tumor, um anteilige maligne, gutartige oder bindegewebige Zellen handelt (114). Auch in unseren Messungen am Knochenmark wurden die Einbauraten auf eine in der Zählkammer ermittelte Gesamtzahl der im Knochenmarkspunktat enthaltenen Zellen bezogen, also auch auf periphere Zellen aus eventuell beigemengtem Blut. Um die Aussagekraft und vor allem die Zuverlässigkeit dieser Methode zu erhöhen, müßte der zu untersuchende Gewebeanteil, wie bei einer Reinkultur, entweder homogen sein oder aufgrund morphologischer Differenzierung in seiner Zusammensetzung genau definiert sein. Dies ist bei einem so heterogenen Gewebe wie Knochenmark nur unter großem Aufwand möglich (z.B. Zellsorter).

Ein anderes, viel verwendetes Verfahren zur Bestimmung der mit <sup>3</sup>H markierten Zellen, bei dem morphologische Aspekte bei heterogenen Geweben berücksichtigt werden können, ist der <sup>3</sup>H - Thymidin - Markierungsindex (M.I.) der Zellen aus Autoradiografien. Wir bestimmten diesen Markierungsindex nur innerhalb des relevanten Proliferationspools der Knochenmarkszellen.

Der M.I. der normalen, unbeeinflussten proliferierenden Knochenmarkszellen unserer 12 Patienten liegt durchschnittlich bei 31,8 %. Dieser Wert korreliert gut mit anderen, in der Literatur für die Gesamtheit der granulopoetischen Zellen genannten Zahlen von 30 % (5) und 34 % (54), sowie mit 37 % für die erythropoetischen Vorstufen (54). In allen, die einzelnen Zelltypen aufgliedernden Arbeiten (5, 20, 21) sind übereinstimmend die M.I. der frühen Vorstufen mit 65 - 90 % wesentlich höher, als die M.I. z.B. der Myelozyten mit 20 - 50 %.

Setzt sich der Knochenmarksgesamtwert schon aus den vielen Werten in sich wahrscheinlich relativ wenig variabler Zellpopulationen zusammen, so gilt dies besonders für maligne Gewebe, die abgesehen von den histologischen Variationen auch eine große Streubreite der individuellen Zellkinetik aufweisen. Menschliche Adenocarcinome haben die niedrigsten M.I. mit 2,1 % (18); Plattenepithelkarzinome haben circa 8,5 %, embryonale Tumore durchschnittlich 30 % (18) und bei einem meningealen Retikulumzellsarkom wurden sogar 60 % ermittelt (54).

Während der 10 - stündigen HU - Infusion fiel der Markierungsindex des normalen Knochenmarks auf 17,9 %, d.h. auf etwas über die Hälfte in statistisch signifikanter Weise ( $P < 0,01$ ), während bei BELT et al. (4) am Ende einer 72 - stündigen HU - Infusion bei 5 Patienten nur eine Reduktion um ca. 10 % gemessen wurde. Bereits 1 - 2 Stunden nach Ende der HU - Wirkung hatte der M.I. etwa 120 % des Ausgangswertes erreicht und stieg signifikant weiter bis auf 49,6 %, das sind 156 % vom Ausgangs-

wert. Zum Vergleich bei BELT et al. (4): 190 % vom 0-Wert 8 Stunden nach Infusionsende.

Der Verlauf hier entspricht also dem der szintigraphisch gemessenen  $3H - TdR$  - Einbauraten genau, allerdings auf anderen Zahlen - Niveaus.

Nach TUBIANA (114) ergaben Vergleiche zwischen M.I. und Szintigraphie - Einbauraten in einigen Experimenten gute Korrelationen, während es bei anderen zu erheblichen Diskrepanzen kam. DETHLEFSEN et al. (14) berichten ebenfalls, daß sich der M.I. und die Einbauraten im Duodenalgewebe von Mäusen hinsichtlich des Verlaufs und des gleichzeitigen Auftretens der Gipfel entsprechen. Die absoluten Prozentwerte des M.I. nach HU aber liegen deutlich höher als die Steigerung der Szintigraphie - Einbauraten. Aus der Höhe der Einbauraten kann also nicht direkt auf die Zahl der S - Phase - Zellen geschlossen werden (14). Für menschliches Knochenmark liegen sonstige vergleichende Daten nicht vor.

Bei vielen Tierversuchen und in vitro-Modellen wurde eine wesentlich deutlichere Verminderung des M.I. unter HU verzeichnet als bei uns (78, 90, 107, 121, 125), denen in der Regel Anstieg um das 2 - 3 - fache der Kontrollwerte folgten. Dies liegt wahrscheinlich an den anderen, oft günstigeren Proliferationsparametern der verwendeten Gewebe, sowie an den Dosierungen und Applikationsdauern, wobei oft deutliche Zytotoxizität in Kauf genommen wurde.

Von größerer Bedeutung ist die Beobachtung, daß bei 4 soliden menschlichen Tumoren, die in vivo 26 - 49 Stunden HU - Blutkonzentrationen zwischen  $2,2 \times 10^{-4}$  M und  $1,5 \times 10^{-3}$  M ausgesetzt waren und im Mittel einen M.I. von 5,5 % aufwiesen, die Markierung unter HU in 2 Tumoren zwar sank, in den anderen 2 aber sogar leicht anstieg. 8 - 10 Stunden nach Blockade hatten 2 Tumore ihren Ausgangswert bei weitem nicht wieder erreicht, beim dritten Tu sank der M.I. nach HU, beim vierten blieb er leicht erhöht (38). Bei fast gleichen Blutspiegeln ergab sich bei den soliden Tumoren also keine dem Knochenmark ähnliche Ver-

änderung des Proliferationsverhaltens. Dies ist aufgrund der bekannten, einer Wachstumsmodifikation entgegenstehenden Eigenschaften solider Tumore, wie lange Generationszeiten, geringe Wachstumsfraktion, große Zellzyklusvariabilität und unterschiedliche Blutversorgung im Tumor nicht überraschend. Deutlich wird jedoch, daß, sollten sich höhere HU - Konzentrationen oder längere Blockdauern als besser geeignet zur in - vivo - Synchronisation von soliden Tumoren erweisen, diese Dosierungen und Blockdauern stark toxisch auf das Knochenmark und andere physiologische Wechselgewebe wirken werden (4, 38).

Während szintimetrische Einbauraten - Bestimmung und autoradiographische M.I. - Messung dynamische Meßverfahren sind, die u.a. davon abhängen, daß die in vitro inkubierten Zellen das gleiche DNS - Synthese - Verhalten zeigen wie in vivo (45), erhält man mit der Durchflußzytophotometrie des DNS - Gehaltes ein statisches Bild, eine Momentaufnahme des Zustandes einer Zelle.

Signifikante Änderungen des Prozentsatzes der Zellen in S - Phase zeigten sich bei den Zellen 7 - 14 Stunden nach HU - Blockende im Vergleich zu den Zellen vor HU; es ergab sich eine Zunahme um ein Drittel. Aber auch während des HU - Blocks war bereits eine vermehrte Anzahl von S - Phase - Zellen zu verzeichnen. Die  $G_1$  - Zellen nahmen von 88 % anfangs über 85 % unter HU auf 83 % nach Blockende ab. Bei den Mitosezellen war, parallel zu den S - Zellen, eine kontinuierliche Zunahme von 2 % über 2,5 % auf 3 % zu sehen. Die geringe Zunahme der Mitosezellen unter HU könnte in Übereinstimmung mit dem Schrifttum (128) dadurch erklärt werden, daß späte S - Zellen ihre DNS - Synthese unter HU noch vervollständigen können.

Da auch hier alle im Knochenmarkpunktat vorhandenen weißen Zellen gemessen wurden, ist eine Verfälschung der Resultate durch Blutbeimischung, also einer größeren Zahl nicht - proliferierender Zellen, nicht auszuschließen. Anhand von Knochenmark-

ausstrichen wurde daher der Anteil der proliferierenden Zellen im jeweiligen Punktat ermittelt. Nur die Zellen des Proliferationspools durchlaufen die S - Phase und erscheinen daher in der Durchflußzytrophotometrie in der S - Bande. Die Zellen des Reifungspool und die peripheren Zellen vergrößern den relativen Anteil der  $G_1$  - Zellen. Korrigiert man die Meßwerte auf den Anteil der proliferierenden Zellen, so erhält man nach Wegfall der nicht - DNS - synthetisierenden Zellen dementsprechend höhere Prozentsätze an S - Phase - Zellen (Tab.6). Diese errechneten Werte korrelieren gut mit den direkt ermittelten. Der Anstieg der S - Phase - Zellen unter HU ist ebenso vorhanden (aber nicht signifikant), wie der Anstieg um die Hälfte des Ausgangswertes im 7 - 14 - Stunden - Bereich nach Ende der HU - Wirkung.

Eine vorherige Abtrennung der nicht - DNS - synthetisierenden Zellen vor der Messung im Zytrophotometer wäre im Sinne zuverlässigerer Ergebnisse nützlich.

Auch FORD und SHACKNEY (30) berichten, daß sich während einer 12 - stündigen HU - Exposition eines Sarkoms 180 in vitro trotz des Abfalls im 3H - TdR - Markierungsindex und in der Markierungsintensität (Silberkornzählung) keine signifikanten Änderungen in der Verteilung des DNS - Gehalts ergaben. 4 Stunden nach Aufheben des "HU - Blocks" war eine vermehrte Ansammlung von Zellen in S zu beobachten, die nach weiteren 8 - 10 Stunden in die späte S - Phase und in den prämitotischen Bereich weiterlief.

Es existieren jedoch auch in vitro und in vivo - Arbeiten (72, 77), bei denen erwartungsgemäß eine Abnahme der S - Phase - Zellen, sowie ein Anstieg der  $G_1$  - Zellen während des "HU - Blocks" dargestellt werden konnte. Nach HU kam es jeweils zu einer Anhäufung von Zellen in der S - Phase und einer Weiterbewegung dieser, z.T. auf das Doppelte (77) angereicherten Zellmenge in die Mitosephase. Bei höherer Dosierung und längerer Einwirkdauer

zeigte sich kein Weiterlaufen der in S akkumulierten Zellen in die Mitose, was in Übereinstimmung mit dem starken Zellverlust in dieser Zeit stand (72).

Daß ein hoher Zellakkumulationsgrad in S per se keineswegs von vorneherein als gelungene "Zellsynchronisation" zu bewerten ist, ergibt sich anhand von Versuchen mit einer menschlichen Lymphoblastenkultur. Hier besteht eine Korrelation zwischen dem Grad der Zellakkumulation in S und dem Anteil der vor der M - Phase in, zytophotometrisch gesehen, Trümmer zerfallenden DNS vieler Zellen. Je höher die "Synchronie" in S, desto größer der anschließende Prozentsatz an Zelltrümmern (77). Der zytotoxische Effekt zeigte sich also erst nach Ende der HU - Einwirkung und nachdem die angeblich in  $G_1$  aufgestauten Zellen vermehrt in die S - Phase eingetreten waren. Nachdem aber HU tatsächlich nur auf in der S - Phase befindliche Zellen toxisch wirkt, besteht die hohe Zahl an Zellen in S nach HU wohl aus den liegenbleibenden geschädigten, weil schon unter HU in S befindlichen Zellen und aus den aus  $G_1$  und womöglich aus  $G_0$  (Recruitment bei starker Toxizität) einlaufenden Zellen. Nur die beiden letzteren dürften dann wohl die Mitose erreicht haben.

Solche durch zytotoxische Effekte bewirkten Zellakkumulationen können aber nicht die Definition der Synchronisation erfüllen, die ein nicht - schädliches Blockieren des Zellzyklus mit anschließend gemeinsamem Weiterlaufen der angehäuften Zellen durch möglichst viele Zyklusphasen verlangt.

Unsere Ergebnisse zeigen keinen Zellakkumulationseffekt am  $G_1/S$  - Übergang des Zellzyklus, sondern vielmehr eine weitgehende Arretierung der S - Phase - Zellen während der HU - Einwirkung. Es wird durch HU kein Abfall der S - Phase - Zellen bewirkt, sondern eher noch eine leichte Zunahme durch Zustrom aus der  $G_1$  - Phase. Auch die Mitose - Zellen nehmen zu, was schließen läßt, daß späte S - Zellen auch während der HU - Einwirkung

unserer Dosierung in die nächste Zyklusphase einzutreten vermögen. Ob die nach HU - Wirkungsende festgestellte, nicht sehr große, gerade noch signifikante Anhäufung der S - Phase - Zellen in unserer Untersuchung synchron in die Mitosephase weiterwandert, kann anhand dieser Versuche nicht gesagt werden. Dies hätte jeweils eine vierte Knochenmarkpunktion zur Bestimmung des Anteils der Mitose - Zellen vorausgesetzt.

Der Trümmeranteil im Zytrophotometer war bei allen unseren Messungen jedoch sehr gering (unter 3 %). Ein Recruitment von  $G_0$  nach  $G_1$  und weiter nach S als Beitrag zur erreichten Ansammlung in S kann weitgehend ausgeschlossen werden, da sich keinerlei Vermehrung von  $G_1$  - Zellen in unserem Beobachtungszeitraum nachweisen ließ.

Aus den Histogrammen ergibt sich somit kein Hinweis auf Toxizität von Hydroxyurea. Ebenso wenig nachweisbar ist der sogenannte "Zellzyklusblock" am  $G_1/S$  - Übergang.

Zieht man in Betracht, daß sich während der 10 - stündigen HU - Infusion die DNS - 3H - TdR - Einbauraten deutlich erniedrigten, die Zahl der sich in der S - Phase befindlichen Zellen aber leicht zunahm, ergibt sich eine Aktivitätsminderung der einzelnen Zelle. Es kann so eine Relation gebildet werden zwischen der Höhe des 3H - TdR - Einbaus und der Zahl der S - Phase - Zellen. Daraus läßt sich die DNS - Synthese - Aktivitätsrate berechnen.

Der direkte Vergleich war bei 8 Patienten möglich und erbrachte eine statistisch signifikante (  $p < 0,01$  ) Verminderung der Aktivitätsrate auf 17 % vom Ausgangswert.

Die gleichen Beobachtungen machten FORD und SHACKNEY (30) in vitro und belegten mittels autoradiographischer Silberkornzählung die Abnahme der Aktivität pro Zelle durch eine Abnahme der Markierungsintensität im Autoradiogramm. Im Zeitraum 7 - 14 Stunden nach HU - Wirkungsende wurde bei unseren Untersuchungen die Ausgangsaktivität wieder erreicht (Abb.10). Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden von SINCLAIR (106), daß, bei

entsprechender Dosis, Zellen, die zur Zeit der HU - Gabe DNS synthetisieren und dann inhibiert werden, nach Aufhebung der Medikamentenwirkung wieder fortfahren, DNS zu bilden.

Was die Restaktivität unter HU anbetrifft, so wird eine Verringerung, aber kein vollständiges Sistieren der DNS - Synthese durch HU von vielen Autoren beschrieben (6, 12, 13, 30, 72, 78, 92, 123). Jedoch gibt es Hinweise, daß während der HU - Einwirkung vor allem pathologische DNS in Form verkürzter Ketten gebildet wird (12, 92, 122), die dann dosisabhängig nur langsam oder gar nicht zu normal großen, zur Replikation benötigten Ketten zusammengebaut werden (12). Nach RAMSEIER et al. (92) würde die für HU beschriebene Hemmung der Ribonukleotiddiphosphatreduktase über eine Reduzierung des Pools an Deoxyribonukleotidtriphosphaten durch das Fehlen von Material zur Nukleotidpolymerisation zur Verkürzung der Ketten führen. Die beobachtete Bildung veränderter DNS wäre also eine direkte Folge der HU - Wirkung.

Wichtig ist die Feststellung, daß nur eine komplette DNS - Synthesehemmung, vor allem durch sehr hohe und lange HU - Dosierung zu einer nicht mehr reparablen Schädigung (kein Zusammenbau der kurzen Ketten) und damit zum Absterben der Zellen führt (92).

Zytotoxische Effekte wären daher durch die Wahl eines geeigneten, nicht vollständigen DNS - Syntheseblocks durch HU weitgehend zu vermeiden (92). Nach in - vivo - Dauerinfusion über 72 Stunden mit einem Blutspiegel von  $1 \times 10^{-3}$  M HU berichten BELT et al. (4) über eine überaus starke Myelosuppression bei 2 Patienten mit einem M.I. unter 1 % und pyknotischen und degenerierten Knochenmarkszellen, während bei Patienten mit  $5 \times 10^{-4}$  M keine solchen Zeichen festgestellt werden konnten, was unseren Ergebnissen entspricht.

Übereinstimmend mit unseren durchflußzytophotometrischen Befunden der Fixierung der Zellen in der S - Phase und nicht am  $G_1/S$  - Übergang während der HU - "Blockade", berichten andere

Autoren über die gleiche Beobachtung mittels der gleichen (30, 72) oder verschiedener Methoden (13, 123). CRESS und GERNER (13) wiesen nach, daß HU das für die DNS - Synthese wichtige Enzym Ornithindecarboxylase (ODC) über noch unklare Mechanismen hemmt. Ein Fehlen von ODC wiederum hemmt die Polyamin-Biosynthese, was nachweislich zu einer starken 3H - TdR - Einbauhemmung in die DNS führt (111). Dieser ODC-Mangel tritt aber erst nach Einlaufen der Zellen in die S - Phase und nach Beginn der DNS - Synthese zutage und limitiert damit die Fortführung der Replikation; d.h. die Zellen laufen von  $G_1$  in die S - Phase ein, beginnen noch mit der DNS - Synthese und werden nach kurzer Zeit an der Weiterführung gehindert, bleiben also in der S - Phase liegen (13). Damit läßt sich das Nicht - Abfallen des S - Zellen - Prozentsatzes und das Nicht - Ansteigen des  $G_1$  - Zellen - Prozentsatzes unter HU bei unseren Zytophotometermessungen sehr gut erklären. Nach Ende der HU - Wirkung steigt auch der ODC - Spiegel an (13).

Insgesamt scheint sich die Beeinflussung der Proliferationskinetik im Sinne einer Partialsynchronisation nicht in "simple stop and go terms" (30) verwirklichen zu lassen, sondern es sollte bedacht werden, daß durch das medikamentöse Eingreifen Veränderungen oder gar Schädigungen in den Zellen gesetzt werden, deren Auswirkungen man nur unter genau definierten Bedingungen positiv nutzen kann.

Um die Frage einer eventuell bestehenden Zytotoxizität unseres HU - Behandlungsschemas weiter zu klären, untersuchten wir die morphologische Zusammensetzung des Knochenmarks auf akute Veränderungen, den Verlauf des peripheren Blutbildes bis zu 4 Wochen nach der HU - Gabe und die Reaktion der morphologisch nicht faßbaren Knochenmarkstammzellen.

Bekannt ist die oft unmittelbar nach Gabe von Zytostatika auftretende, dosisabhängige, z.T. rasch reversible, z.T. länger anhaltende Toxizität auf die hämopoetischen Zellerneuerungssysteme. So fielen nach einer einmaligen Gabe von 50 mg HU/kg

Körpergewicht die peripheren Leukozyten bei 12 Patienten mit AML innerhalb von 24 Stunden durchschnittlich auf 60 % vom Ausgangswert und in Einzelfällen wesentlich stärker ab (77, 99).

Bei unseren Tumorpatienten mit normalem, intaktem Knochenmark zeigte sich 24 Stunden nach der 10 - stündigen HU - Infusion mit 96 % vom Ausgangswert kein Abfall der peripheren Leukozyten. Bei einer durchschnittlichen Knochenmarksdurchgangszeit, d.h. dem Auftreten von Granulozyten ab Beginn der Myeloblastenteilung, von ca. 10 - 12 Tagen (3) wäre bei einer nennenswerten Schädigung der frühen Vorstufen ein deutliches Sinken der peripheren Leukozyten in diesem Zeitraum nach HU - Gabe zu erwarten. Vor allem, da man in der Myelopoese ab dem Myeloblasten 4 Teilungsschritte annimmt (21) und sich so eine Verkleinerung dieses frühen Kompartments in ihren Auswirkungen vervielfacht darstellen würde. LOHRMANN et al. (66, 67) berichten über solche Verläufe nach Cyclophosphamid - Therapie mit dem Nadir der Leukozyten zwischen dem 10. und 14. Tag nach Behandlung. BELT et al. (4) geben den Nadir am 13. Tag nach 72- stündiger HU - Gabe mit Blutkonzentrationen von  $1 \times 10^{-3}$  M an, wobei bei allen 7 Patienten deutliche Myelosuppression zu sehen war. Nach der HU - Gabe von insgesamt 75 mg/kg KG über 10 Stunden war bei unseren Patienten kein signifikantes Absinken der peripheren Leukozyten, ja nicht einmal ein Abfall unter den Normbereich festzustellen. Auch die Werte der Erythrozyten, deren Knochenmarksdurchgangszeit etwas mehr als 6 Tage dauert (19), und der Thrombozyten lassen keinen Schluß auf eine Beeinträchtigung ihrer proliferierenden Vorstufen zu.

Die morphologischen Differenzierungen von Knochenmarkausstrichen dienten dazu, eine eventuelle Schädigung des Proliferationsspeichers schnell zu erfassen, wobei einzuwenden ist, daß die Untersuchungszeitpunkte mit 7 bis maximal 16,5 Stunden sehr kurz nach Ende der HU - Wirkung lagen. Spätere Untersuchungen hätten jedoch weitere Knochenmarkpunktionen bedeutet.

Die beobachtete leichte Rechtsverschiebung zuungunsten des Proliferationspools lag im Rahmen der normalen Variationsbreite (3) (Abb.11).

Das zahlenmäßige Verhältnis der weißen zu den roten Vorstufen, der M/E - Quotient, dessen Veränderung eine selektive Wirkung auf eines der beiden Zellsysteme gezeigt hätte, blieb praktisch unverändert und lag im Bereich der von LOHRMANN et al. (67) ermittelten Prä - Therapie - Werte.

Von grundlegender Bedeutung für die Einschätzung der Proliferationskapazität des Knochenmarks sind Untersuchungen an den morphologisch nicht identifizierbaren Vorläuferzellen der Hämatopoese. Aufgrund unterschiedlicher funktioneller Eigenschaften gelang die Unterscheidung in die wenig proliferierenden pluripotenten Stammzellen, mit einer durch die HU - suicide - Technik bestimmten Wachstumsfraktion von 10 - 20 % (94) und in die stärker proliferierenden, bereits in eine der drei hämatopoetischen Zelllinien differenzierten sogenannten determinierten Stammzellen.

Mit einer für menschliche myeloisch determinierte Stammzellen (colony forming units in culture, CFUc) entwickelten HU - suicide - Technik (73), bei der der gezielte S - Phasen - Kill von hochdosiertem HU genutzt wird, fand man ca. 35 - 39 % dieser Zellen in Teilung (109). Mit einer in vivo verabreichten Menge an HU sind diese CFUc also stärker beeinflussbar, als die pluripotenten Stammzellen. TUBIANA et al. (114) fanden, daß nach einer einmaligen Gabe von HU in vivo an den Stammzellen von Mäusen nicht nur synchronisierende Wirkung, sondern vor allem ein Recruitment anzunehmen war, und zwar bereits 8 bis 10 Stunden nach HU. Vor HU - Anwendung wenig proliferierende Stammzellen ließen sich nach 12 Stunden bis zu 45 % aus  $G_0$  in die S - Phase triggern (114). "Synchronisation" und "Recruitment" konnten, da sie gemeinsam auftraten, bzw. das eine möglicherweise das Produkt des anderen ist, nicht unterschieden werden.

Durch gemeinsame Inkubation von in vivo mit HU oder Bestrahlung vorbehandeltem mit nicht behandeltem Mäuseknochenmark gelang FRINDEL et al. (32) der Nachweis eines von den vorbehandelten Knochenmarkzellen freigesetzten Stimulationsfaktors, der die vorher wenig teilungsaktiven unbehandelten Zellen in den Proliferationszyklus eintreten ließ, also zum Recruitment führte. Eine Identifikation dieses von HU - behandelten Stammzellen innerhalb von Stunden produzierten Trigger - Faktors erfolgte noch nicht.

Wir untersuchen mit der CFUc - Cloningtechnik die Frage, ob die von uns in vivo verabreichte Dosis HU zu toxischen Veränderungen des Wachstums der anschließend kultivierten CFUc führte. Dabei bestimmten wir die relative Zahl an Knochenmark-CFUc pro  $10^5$  eingesetzte Knochenmarkzellen.

Die Ergebnisse von 5 Patienten zeigten kein einheitliches Bild. Bei 2 Patienten verringerte sich die Zahl der CFU - Kolonien aus dem während der HU - Infusion entnommenen Knochenmark um 26 % vom Ausgangswert, d.h. es scheint eine relativ rasche Schädigung eines Teils der Stammzellen eingetreten zu sein, die ihnen die Ausbildung von Zellklonen unmöglich machte. Bei einem Patienten stellte sich 12 Stunden nach HU - Wirkungsende eine Verdoppelung der ursprünglichen CFU - colonies heraus, was für ein promptes Recruitment spricht. Bei der anderen Patientin wurde die Ausgangszahl nicht mehr erreicht, sodaß eine größere Beeinträchtigung der Stammzellpopulation eingetreten sein muß, die es ihr nicht erlaubte, sich im gegebenen Zeitraum zu regenerieren.

Ein völlig anderes Bild bieten die anderen 3 Patienten. Hier stieg die Zahl der CFUc noch während der HU - Infusion auf 150 bis 193 % vom Ausgangswert an.

SCHREML et al. (101) konnten zeigen, daß die schädigende Wirkung von HU auf Stammzellen bereits nach 6 Stunden abgeschlossen sein kann, d.h. dadurch auch schon in diesem Zeitraum Recruitment ausgelöst werden kann. Auch das während einer 10 - stündigen HU - Infusion ausgelöste Recruitment würde die Zellen erst in  $G_1$  triggern, wo sie von HU nicht getroffen werden. Nach der Auf-

hebung von HU im Kulturmilieu steht dann eine vermehrte Anzahl von Stammzellen im Proliferationszyklus und führt zum gemessenen vermehrten Koloniewachstum. 10 bis 14 Stunden nach HU - Wirkungs-ende in vivo war bei allen 3 Patienten wieder eine Rückkehr zur Ausgangszahl an CFUc zu sehen, d.h. ein anhaltender Effekt von HU, besonders im Sinne einer Zytotoxizität kann hier nicht gefolgert werden. Die Zahl der CFUc von Mäusen, die in vivo mit einer höheren Dosis HU behandelt wurden, betrug nach 24 Stunden 94 % des Ausgangswerts und war somit kaum reduziert (25).

Während sich also durch die HU - induzierte DNS - Synthesehemmung bei den differenzierten proliferierenden Knochenmarkzellen im Durchschnitt von 20 Patienten keine Zytotoxizität belegen läßt, bzw. bei 4 Patienten von 10 aufgrund der Untersuchungsmethode fraglich ist, scheinen die myeloisch determinierten Stammzellen empfindlicher zu reagieren. Eine größere Verminderung an CFUc, wie sie nach Cyclophosphamid - Gabe beobachtet wurde (67), kann in unserem Untersuchungszeitraum aber ausgeschlossen werden, was wir durch den Verlauf der peripheren Blutzellzahl bestätigen können. Dem starken CFUc-Abfall nach Cyclophosphamid folgte nämlich nach 7 bis 9 Tagen, ungefähr der Knochenmarkdurchgangszeit entsprechend, eine Verminderung der peripheren Leukozyten (66).

Zur Methodenkritik muß noch auf das Problem der verschieden starken Blutbeimengung in Knochenmarkpunktaten hingewiesen werden. Zwar erfolgte vor der CFUc - Kultur bereits eine Isolierung der mononukleären Zellen, d.h. eine Abtrennung der störenden stab- und segmentkernigen Granulozyten, doch sind auch im peripheren Blut Stammzellen zu finden, die aber eine wesentlich geringere Proliferationstendenz aufweisen als die Stammzellen des Knochenmarks (67, 109). Eine große Blutbeimengung kann also über die relativ größere Zahl von peripheren CFUc zu einer künstlich niedrigeren Anzahl an wachsenden Kolonien in der Kultur führen.

Nach diesen Ausführungen zu den gestellten und den sich erst während der Arbeit ergebenden Problemen soll noch einmal zu den einzelnen Fragen Stellung genommen werden.

Die 10 - stündige Dauerinfusion von HU via Nasen - Magensonde nach Vorgabe einer erhöhten Einzeldosis (Push) erwies sich als gut zu handhabende Applikationsform. Der vorgegebene Blutspiegelbereich wurde schnell erreicht und konstant gehalten, und entspricht in der Konzentration den Angaben neuerer, später veröffentlichter Literatur (4, 30). Die damit erzielten Einwirkzeiten, sowie die Halbwertzeiten sind deutlich individuelle Größen, liegen jedoch gut innerhalb vorhersagbarer Bereiche.

Die durchschnittlich 15 - stündige Einwirkung von HU führte zu charakteristischen Veränderungen im Wachstumsverhalten der Knochenmarkzellen. Unsere Untersuchungen machen eine weitgehende Arretierung der Zellen in der S - Phase durch HU wahrscheinlich. Anhand der Arbeiten anderer Autoren (13, 92, 123) läßt sich dieser Stop in der S - Phase als direkte Folge der dosisabhängigen DNS - Synthese - Inhibition, i.E. durch das Aufhalten der teilweise schon begonnenen Replikation vermuten.

Während der HU - Wirkung scheint es einem Teil der Zellen möglich zu sein, die S - Phase zu verlassen. Das Einlaufen von der  $G_1$  - Phase in die S - Phase ist nicht gehemmt, eine Zellanhäufung am  $G_1/S$  - Übergang kann von uns nicht berichtet werden. Die stark verminderte DNS - Syntheseleistung bei gleicher Anzahl von Zellen in S läßt neben der Inhibition während der S - Phase auch auf eine verringerte Aktivität dieser Zellen im Sinne einer Restsynthese schließen.

Der in der Literatur beschriebene  $G_1/S$  - Block könnte Effekt eines gezielten S - Phase - Kills durch hochdosierte und langdauernde HU - Anwendung mit anschließend starkem Recruitment sein. Aufgrund beider Mechanismen ist eine nachfolgende sogenannte Synchronisation erklärbar.

Der nach Ende der HU - Wirkung gesteigerte 3H - TdR - Einbau und - Markierungsindex ist mit der Wiederaufnahme der DNS -

Stoffwechselaktivität der vorher inhibierten Zellen sowie mit dem additiven Einlauf von während der HU - Anwendung nicht geblockten  $G_1$  - Zellen in die S - Phase gut zu begründen. Dies wird mittels der zytophotometrischen Ergebnisse durch den Anstieg der S - Phase - Zellen während und nach HU - Gabe belegt. Insgesamt wird die DNS - Synthese - Aktivität pro Zelle nach HU im gleichen Maß wie vorher erreicht.

Eine Knochenmarktoxizität unserer HU - Behandlung ist weder bei den morphologisch differenzierbaren Knochenmarkzellen während und kurz nach HU - Infusion, noch im peripheren Blutbild bis zu 4 Wochen nachher festzustellen. Bei den granulopoetisch determinierten Stammzellen ist eine Schädigung in einem Teil der Fälle jedoch nicht auszuschließen.

Von einer "Synchronisation" kann nur auf Grund des gesteigerten  $3H$  - TdR - Einbaus und des erhöhten Markierungsindex nach Ende der Medikamentenwirkung keinesfalls gesprochen werden. Andere Autoren (4) verwenden diesen Terminus allerdings zur Beschreibung ähnlicher Ergebnisse.

Nach unserer Erkenntnis läßt sich in nicht - toxischer Dosierung kein "stop and go" des Zellzyklus proliferierender Knochenmarkzellen erreichen. Es handelt sich vielmehr um ein "slow down" der DNS - Synthese - Aktivität in der S - Phase, was für die Dauer der Medikamenteneinwirkung zu einer tolerierten Arretierung dieser Zellen in der S - Phase führt.

Diese Tatsache führt zu Überlegungen hinsichtlich eines Therapiekonzeptes. Voraussetzung dafür ist, daß Tumorzellen weniger empfindlich in ihrer Zellkinetik beeinflußt werden wie Knochenmarkzellen. Dies läßt sich besonders bei soliden Tumoren mit ihren, einer medikamentösen Modifikation ungünstigen Proliferationseigenschaften vermuten. So könnte nach einer durch HU induzierten reversiblen Arretierung der Knochenmarkzellen, aber einem Weitermarschieren der nicht beeinflussten Tumorzellen ein zweiter zytozydierender Therapieschritt gegen die Tumorzellen mit einem nicht - S - phasenspezifischen Chemotherapeutikum erfolgen. Ein solches,

auf den Grundlagen der Zellkinetik aufbauendes Therapiekonzept erfordert aber immer noch die Kenntnis der individuellen Zellcharakteristiken der verschiedenen Tumorgewebe, sowie Auswahl des nach Sensibilität und Pharmakokinetik geeigneten Zytostatikums.

Solange nicht verlässliche, breit fundierte Daten der spezifischen Tumore vorgelegt werden können, bleibt die Planung des beschriebenen Therapiekonzepts auf Einzelfälle beschränkt und verlangt aufwendige Vorarbeiten. Der Fortschritt bei den proliferationskinetischen Untersuchungstechniken könnte gesicherte Erkenntnisse in absehbarer Zeit ermöglichen. Die zu fordernde Resistenz des Tumorgewebes gegen die auf Knochenmark wirksame HU - Konzentration kann bereits durch in - vitro - Tests untersucht werden (84).

Inwieweit sich durch dieses Konzept ein verbesserter Schutz physiologischer Wechselgewebe, speziell des Knochenmarks, vor den toxischen Wirkungen des zytoziden Tumor - Therapieschrittes verifizieren läßt, die eigentliche Absicht dieses Schemas also, müßte in mehreren experimentellen Untersuchungen geklärt werden.

Ein weiterer, völlig anderer Ansatz ergibt sich aus dem Vergleich unserer Ergebnisse an normalem Knochenmark mit den Befunden von SAUER und Mitarbeitern (99) an AML - Zellen. Dort zeigte sich nach einmaliger Gabe im gleichen HU - Konzentrationsbereich eine teilweise starke Zytotoxizität auf die malignen Zellen, sodaß es bereits 24 Stunden nach HU - Behandlung zu einer im peripheren Blut gemessenen Verminderung kam. Mittels der oralen Dauerinfusion von HU ließe sich diese unterschiedliche Sensibilität unter Vermeidung von für die Normalzellen toxischen Spitzen der Blutkonzentration für die Therapie von Leukosen nützen. Dies wäre vor allem in Fällen mit histologisch gesichertem Restanteil normalen Knochenmarks und in Remissionsphasen als Erhaltungstherapie zu überprüfen.

Zusammenfassend läßt sich die Frage nach der Möglichkeit des nicht - toxischen modifizierenden Eingreifens in die Proliferationsvorgänge normaler Knochenmarkzellen mit Hydroxyurea durchaus bejahen. Es zeigt sich aber einmal mehr, wie weit der Weg von den Ergebnissen der proliferationskinetischen Grundlagenforschung zu einer rationalen Chemotherapie ist. Die chemotherapeutische Behandlung maligner Erkrankungen wird sicher noch längere Zeit auf den Resultaten der klinisch-empirischen Forschung basieren.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hydroxyurea liegen die meisten experimentellen Erfahrungen zur Steuerung der Proliferationszyklus maligner und normaler Gewebe vor. Von vielen Autoren wird eine reversible Blockierung des Zellzyklus am  $G_1/S$  - Übergang mit anschließend überschießendem Einlaufen der Zellen in die S - Phase angenommen.

Bei 20 an Malignomen erkrankten Patienten mit intaktem Knochenmark wurde eine 10 - stündige perorale Dauerinfusion mit Hydroxyurea in nicht - zytotoxischer Konzentration durchgeführt. Vor, während und nach HU - Gabe entnommenes Knochenmark wurde autoradiographisch und liquidszintimetrisch auf den 3H - TdR - Einbau, durchflußzytophotometrisch auf Zellphasenverteilung, morphologisch und mittels CFUc untersucht.

Nach einem Push von 25 mg/kg KG wurden 5 mg/kg KG und Stunde infundiert. Die Blutspiegel lagen nach 1 Std. konstant im festgelegten Bereich von  $5 \times 10^{-4}$  M. Bei einer Halbwertszeit von 200 Minuten betrug die durchschnittliche Wirkungszeit 15,5 Std. Klinische Toxizität und Myelosuppression traten weder akut noch bis zu 4 Wochen nachher auf. Eine Schädigung von Stammzellen (CFUc) kann bei einem Teil der Untersuchten nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden.

Der 3H - TdR - Einbau in die Knochenmarkszellen ging unter HU auf 16 % des Ausgangswerts zurück und stieg 10 Std. nach HU - Wirkungs-ende auf 156 % an. Zytophotometrisch konnte während HU keine Abnahme von S - Phase - Zellen oder Zunahme von Zellen am  $G_1/S$  - Übergang nachgewiesen werden. 10 Std. nach Unterschreiten der minimalen Hemmkonzentration kommt es zum Anstieg der S - Zellen auf 129 % des Ausgangswerts. Unter HU befinden sich gleichviele Zellen in S, die weit weniger 3H - Thymidin einbauen, nach HU bauen mehr S - Phase - Zellen mehr 3H - Thymidin ein als vor HU. Die DNS - Synthese - Aktivität vermindert sich während HU - Wirkung auf 17 % und erreicht nachher mit 105 % wieder den Ausgangswert. Hydroxyurea in nicht - toxischer Konzentration bewirkt beim menschlichen Knochenmark eine temporäre DNS- Synthese - Inhibition im Sinne einer Aktivitätsminderung und eine teilweise Arretierung in S. Ein stop-and-go des Zellzyklus durch HU bleibt aus, es kommt vielmehr zu einem slow-down der DNS - Synthese. Diese mögliche Beeinflussung der Proliferationskinetik nützende Therapiekonzepte müssen noch experimentell untermauert werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Adams R.L.P., Lindsay J.G.  
Hydroxyurea, reversal of inhibition and use as a cell - synchronizing agent  
J.biol. chem. 243, 1314 - 1317 (1967)
- 2 Adamson R.H., Ague S.L., Hess S.M., Davidson J.D.  
The distribution, excretion and metabolism of Hydroxyurea - C 14  
J.pharmacol.exptl.therap. 150, 322 - 327 (1965)
- 3 Begemann H. (Hsgb.)  
Klinische Hämatologie  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1975), 55 -62
- 4 Belt R.J., Haas C.D., Kennedy J., Taylor S.  
Studies of Hydroxyurea administered by continuous infusion  
Cancer 46, 455 - 462 (1980)
- 5 Boll I.  
Das granulozytäre Zellsystem  
in: Das Knochenmark Hsgb.: Queißer W.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978), 11 - 14
- 6 Boyum A.  
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human peripheral blood  
Scand.J.Clin. Lab.Invest 21, 77 - 89 (1968)
- 7 Brinkmann W., Dörmer P.  
In-vitro-Verfahren zur Bestimmung der DNS-Synthese-Dauer einzelner Zellen. Biochemische Voraussetzungen und Ergebnisse  
Histochemie 30, 335 - 343 (1972)
- 8 Brown J.S., Wheatley D.N.  
DNA synthesis in the presence of Hydroxyurea  
Br.J.Cancer 30 (2), 173 (1974)
- 9 Butler W.B., Müller G.C.  
Control of Histone synthesis in HeLa cells  
Biochim.biophys.acta 294, 481 - 496 (1974)
- 10 Camplejohn R.S., Schultze B., Maurer W.  
In vivo cell synchrony in the L 1210 mouse leukemia studied with 5 - Fluorouracil followed by cold Thymidine infusion  
Br.J.Cancer 35, 546 - 556 (1977)

- 11 Colvin M., Bono Jr. V.H.  
The enzymatic reduction of Hydroxyurea to urea by mouse liver  
Cancer Res. 30, 1516 - 1519 (1970)
- 12 Coyle M.B., Strauss B.  
Cell killing and the accumulation of breaks in the DNA of HEP - 2 cells incubated in the presence of HU  
Cancer Res. 30, 2314 - 2319 (1970)
- 13 Cress A.E., Gerner E.W.  
Hydroxyurea inhibits ODC induction, but not the G 1 to S phase transition  
Biochem.and Biophys.Res.Comm. Vol. 87 No. 3, 773 - 780 (1979)
- 14 Dethlefsen L.A., Ohlsen J.D., Roti Roti J.L.  
Cell synchronisation in vivo: fact or fancy ?  
in: Growth kinetics and biochemical regulation of normal and malignant cells, Eds.: Drewinko B., Humphrey R.M.  
Baltimore (1976), 491 - 505
- 15 Dethlefsen L.A., Riley R.M.  
Hydroxyurea effects in the C3H mouse. I - Duodenal crypt cell kinetics  
Cell Tiss.Kinet. 6, 3 (1973)
- 16 Dethlefsen L.A., Sorensen S.P., Riley R.M.  
Effects of double and multiple doses of Hydroxyurea on mouse duodenum and mammary tumors  
Cancer Res. 35, 694 - 699 (1975)
- 17 Dörmer P.  
Die Variabilität der DNS - Synthesedauer einzelner Zellen: Methodik und Auswirkung auf das therapeutische Konzept  
in: Aktuelle Probleme der Therapie maligner Tumore, Hsgb.: Wüst G.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1973) 168 - 185
- 18 Dörmer P.  
Adjuvante zytostatische Chemotherapie: Zellkinetische Grundlagen  
Hämatologie und Bluttransfusion 22, 3 - 14 (1978)
- 19 Dörmer P.  
Zellkinetik im erythrozytären System  
Ärztl.Lab. 23, 57 - 62 (1977)

- 20 Dörmer P.  
Das erythrozytäre Zellsystem  
in: Das Knochenmark Hsgb.: Queißer W.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978), 150 - 166
- 21 Dörmer P., Brinkmann W.  
Proliferationskinetik der normalen Myelopoese des Menschen  
in: Erkrankungen der Myelopoese Hsgb.: Stacher A., Höcker P.  
Urban u. Schwarzenberg Verlag, München, Berlin, Wien (1976), 31 - 33
- 22 Dresler W.F.C., Stein R.  
Über den Hydroxyharnstoff  
Ann.Chim. 150, 242 - 252 (1869)
- 23 Drings P., Graf von Keyserlingk D.  
Gewinnung und Aufbereitung von Knochenmark  
in: Das Knochenmark Hsgb.: Queißer W.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1978), 3 - 11
- 24 Drings P., Löffler H.  
Anwendung wichtiger Färbeverfahren und zytochemischer Reaktionen  
in: Das Knochenmark Hsgb.: Queißer W.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978), 11 - 13
- 25 Dumenil D., Sainteny F., Frindel E.  
Some effects of chemotherapeutic drugs on bone marrow stem cells  
Cancer Chemother.Pharmacol. 2, 197 - 201 (1979)
- 26 Fabricius E., Rajewski M.F.  
Determination of Hydroxyurea in mammalian tissues and blood  
Eur.J.Clin.Biol.Res. 16, 679 - 683 (1971)
- 27 Farber E., Baserga R.  
Differential effects of Hydroxyurea on survival of proliferating cells in vivo  
Cancer Res. 29, 136 - 139 (1969)
- 28 Fischer W., Fischer J.  
Zytostatische Therapie onkologischer Erkrankungen  
in: Internistische Therapie 1980 Hsgb.: Wolff H.P., Weihrauch T.R.  
Urban und Schwarzenberg Verlag, München, Wien, Baltimore (1980), 733 - 748

- 29     Fleischer W., Pelka R.  
A practical analysis of DNA histograms with a laboratory computer  
in: Third international symposium pulse cytophotometry, Ed.: Lutz D., Gent (1978), 137 - 143
- 30     Ford S.S., Shackney S.E.  
Lethal and sublethal effects of Hydroxyurea in relation to drug concentration and duration of drug exposure in Sarcoma 180 in vitro  
Cancer Res. 37, 2628 - 2637 (1977)
- 31     Frenkel E.P., Skinner W.N., Smiley J.D.  
Studies on a metabolic defect induced by Hydroxyurea  
Cancer chemotherapy rept. 40, 19 - 22 (1964)
- 32     Frindel E., Croizat H., Vassort F.  
Stimulating factors liberated by treated bone marrow: in vitro effect on CFU kinetics  
Exp. Hemat. 4, 56 - 61 (1976)
- 33     Gavosto F., Pileri A.  
Cell cycle of cancer cells in man  
in: The cell cycle and cancer, Ed.: Baserga R., New York (1971), 99 - 128
- 34     Gibson M.H.L., Bertanlanffy F.D.  
In vivo synchrony of solid B 16 melanoma by cytosine arabinoside, an inhibitor of DNA synthesis  
J.Nat.Cancer Inst. 49, 1007 - 1018 (1972)
- 35     Gilette E., Withers R., Tannock I.F.  
The age sensitivity of epithelial cells of mouse small intestine  
Radiology 96, 639 (1970)
- 36     Gross R., Klein H.O.  
Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der zytostatischen Kombinationschemotherapie  
Deutsches Ärzteblatt 38, 2121 - 2128 (1978)
- 37     Hartenstein R.  
Neuere Aspekte der Chemotherapie maligner Tumore  
Münch.med.Wschr. 120, Nr. 35, 1127 - 1132 (1978)
- 38     Hartenstein R.  
Untersuchungen zur Wachstumsmodifikation proliferierender Tumorzellen durch medikamentös induzierte Synchronisation  
Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München (1979)

- 39 Hartenstein R., Ehrhart H., Hoffmann K.  
Zellkinetische Untersuchungen beim Ehrlich-Aszites-Tumor unter Vincristin  
Z.Krebsforsch. 79, 213 - 220 (1973)
- 40 Hartenstein R., Ertl E., Possinger K., Ehrhart H.  
Einfluß von Hydroxyurea auf die DNS - Synthese menschlichen Knochenmarks in vivo  
Klin. Wochenschr. 57, 1191 - 1193 (1979)
- 41 Hartenstein R., Possinger K., Ehrhart H.  
Synchronization therapy - an alternative to conventional chemotherapy?  
in: Georgin, A. (Hsgb.) Vortr. Dtsch. Krebsges.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,  
New York, Vol. 3 (1982), im Druck
- 42 Hartenstein R., Pfundmair K., und Possinger K.  
Partialsynchronisation von Tumorzellen in vivo mit Hydroxyharnstoff  
Z. Krebsforsch. 88, 261 - 272 (1977)
- 43 Herken R., Merker H.-J., Krowke R.  
Investigation of the effect of Hydroxyurea on the cell cycle and the development of necrosis in the embryonic CNS of mice  
Teratology 18, 103 - 107 (1978)
- 44 Hill B.T.  
The relevance of certain concepts of cell cycle kinetics  
Biochim.a.Biophys. Acta 516, 389 - 417 (1978)
- 45 Hill B.T.  
The management of human solid tumors: some observations on the relevance of traditional cell cycle kinetics and the value of certain recent concepts  
Cell.Biol.Int.Rep. Vol. 2, No. 3, 215 - 230 (1978)
- 46 Hodgson G., Blackett N.  
In vivo synchronisation of hemopoietic stem cells with Hydroxyurea  
Exp.Hemat. 5, 423 - 426 (1977)
- 47 Hoelzer D.  
Zellkinetische Techniken - Autoradiographie  
in: Das Knochenmark Hsgb.: Queißer W.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978), 47 - 52

- 48 Howard A., Pelc S.R.  
The synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage  
Heredity 6, 261 - 273 (1953), Suppl.
- 49 Jellinghaus W., Maidhof R., Schultze B., Maurer W.  
Experimentelle Untersuchungen und zellkinetische Berechnungen zur Frage der Synchronisation mit Vincristin in vivo (Mäuseleukämie L 1210, Kryptenepithelien d. Maus)  
Z.Krebsforsch. 84, 161 - 176 (1975)
- 50 Jentzsch K.  
Experimentelle Untersuchungen zur radiologischen Behandlung "synchronisierter" Tumore  
Habilitationsschrift der Universität Wien (1976)
- 51 Kim H., Gelbard A.S., Perez A.G.  
Action of Hydroxyurea on the nucleic acid metabolism and viability of HeLa cells  
Canc.Res. 27, 1301 - 1305 (1967)
- 52 Klein H.O.  
Chemotherapie maligner Tumore und akuter Leukosen  
Fortschritte d. Med. 90. Jg., Nr. 10, 369 (1972)
- 53 Klein H.O., Gross R.  
Die Bedeutung der partiellen Synchronisation und der Zellkinetik für den zeitgemäßen Einsatz von Zytostatika  
Deutsches Ärzteblatt 39, 2195 - 2202 (1978)
- 54 Klein H.O., Lennartz K.J.  
In - vitro - Untersuchung zur Proliferationskinetik von Erythroblasten, myeloischen Vorstufen und Tumorzellen des Menschen  
Med. Welt 21/43, 1853 - 1855 (1970)
- 55 Klein H.O., Lennartz K.J., Gross R., Eder M., Fischer R.  
In - vivo - und in - vitro - Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen  
Dtsch. med. Wschr. 97, 1273 - 1282 (1972)
- 56 Krakoff J.H., Brown N.C., Reichard P.  
Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by Hydroxyurea  
Canc.Res. 28, 1559 - 1565 (1968)

- 57 Krishan A.  
Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining  
The journal of cell biology, Vol. 66, 188 - 193 (1975)
- 58 Krowke R., Bochart G.  
Inhibition of RNA synthesis is a possible mode of the embryotoxic action of Hydroxyurea  
Naunyn - Schmiederberg's Arch.Pharmacol. 288, 7 - 16 (1975)
- 59 Kubanek B., Bock O., Heit W., Bock E., Harriss E.B.  
Size and proliferation of stem cell compartments in mice after depression of erythropoiesis  
Reprinted from Haematopoietic Stem Cells, Ciba Foundation Symposium 13, 243 - 263  
Amsterdam (1973)
- 60 Kubanek B., Heit W.  
Die hämopoetischen Stammzellen  
in: Das Knochenmark Hsgb.: Queißer W.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978), 135 - 143
- 61 Lampkin B.C., Nagao T., Mauer A.M.  
Synchronization of the mitotic cycle in acute leukemia  
Nature (London) 222, 1274 - 1275 (1969)
- 62 Lampkin B.C., Nagao T., Mauer A.M.  
Synchronization and recruitment in acute leukemia  
J.clin.Invest. 50, 2204 - 2214 (1971)
- 63 Lieberman M.W., Sell S., Farber E.  
Deoxyribonucleoside incorporation and the role of Hydroxyurea in a model lymphocyte system for studying DNA repair in carcinogenesis  
Canc. Res. 31, 1307 - 1312 (1971)
- 64 Lennartz K.J., Maurer W.  
Autoradiographische Bestimmung der DNS - Verdoppelung und der Generationszeit beim Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus durch Doppelmarkierung mit C14- und H3 - Thymidin  
Z.Zellforsch. 63, 478 - 495 (1964)
- 65 Lohrmann H.-P.  
Thymidine-suicide of human granulocytic progenitor cells  
Biomedicine 28, 319 - 323 (1978)

- 66 Lohrmann H.-P., Schreml W., Fliedner W., Heimpel H.  
Reaction of human granulopoiesis to high-dose cyclophosphamide therapy  
Blut 38, 9 - 16 (1979)
- 67 Lohrmann H.-P., Schreml W., Fliedner W., Heimpel H.  
Früh- und Spätveränderungen der Granulozytopenie unter intermittierender adjuvanter Chemotherapie des Mamma-Karzinoms  
Hämatologie und Bluttransfusion 22, 15 - 23 (1978)
- 68 Madoc-Jones H., Mauro F.  
Age response to X-rays, Vinca alkaloids and Hydroxyurea of murine lymphoma cells synchronized in vivo  
J.Nat.Cancer Inst. 45, 1131 (1970)
- 69 Malkinson F.D., Griem M.L., Marianovic R.  
Effects of Hydroxyurea and radiation on hair matrix cells  
Cell Tissue Kinet. 6, 395 (1973)
- 70 Mendelsohn M.L.  
The growth fraction: a new concept applied to tumors  
Science 132, 1496 (1960)
- 71 Mendelsohn M.L., Takahashi M.  
A critical evaluation of the fraction of labeled mitoses method as applied to the analysis of tumor and other cell cycles  
in: The cell cycle and cancer, Ed.: Baserga R., New York (1971), 58 - 95
- 72 Moran R.E., Strauss M.J.  
Cytokinetic analysis of L 1210 leukemia after continuous infusion of Hydroxyurea in vivo  
Canc. Res. 39, 1616 - 1622 (1979)
- 73 Morardet N., Parmentier C.  
Description of a suicide technique in vitro for granulocytic stem cells (CFUc) by Hydroxyurea on normal human bone marrow  
Biomedicine 27, 349 - 353 (1977)
- 74 Mueller G.C.  
Biochemical perspectives of the G 1 and S intervals in the replication cycle of animal cells: a study in the control cell growth  
in: The cell cycle and cancer, Ed.: Baserga R., New York (1971), 269 - 307

- 75 Nias A.H.W., Fox M.  
Synchronization of mammalian cells with respect to  
the mitotic cycle  
Cell Tissue Kinet. 4, 375 - 398 (1971)
- 76 Patt H.M., Quastler H.  
Radiation effects on cell renewal and related systems  
Physiol.Rev. 43, 357 - 396 (1963)
- 77 Pelka R.  
Zur Wirkung von Hydroxyharnstoff auf die Wachstums-  
kinetik menschlicher Lymphoblastenkulturen und Leu-  
kämiezellen: Durchflußzytometrische und biochemische  
Untersuchungen  
Diplomarbeit (Biologie) an der Universität Tübingen (1977)
- 78 Pfundmair C.  
Untersuchungen zur Zytotoxizität und Beeinflussung der  
Proliferationskinetik durch Hydroxyharnstoff am  
Yoshida-Aszites Sarkom und Knochenmark der Ratte  
Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München (1977)
- 79 Pike B.L., Robinson W.A.  
Human bone marrow colony growth in agar-gel  
J.cell.Physiol. 76, 77 - 84 (1970)
- 80 Philips F.S., Sternberg S.S., Schwartz H.S., Cronin A.P.,  
Sodergren J.E., Vidal P.M.  
Hydroxyurea: acute cell death in proliferating tissues  
in rats  
Canc.Res. 27, 61 - 74 (1967)
- 81 Pilgrim C., Maurer W.  
Autoradiographische Bestimmung der DNS - Verdopplungs-  
zeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei  
Doppelmarkierung mit H3- und C14 - Thymidin  
Naturwiss. 49, 544 - 545 (1962)
- 82 Plagemann P.C.W., Erbe J.  
Intracellular conversion of deoxyribonucleosides by  
Novikoff rat hepatoma cells and effects of Hydroxyurea  
J.cell. Physiol. 83, 321 - 336 (1974)
- 83 Pollak R.D., Rosenkranz H.S.  
Metabolic effects of Hydroxyurea on BHK-21 cells trans-  
formed by polyoma virus  
Canc.Res. 27, 1214 - 1224 (1967)
- 84 Possinger K., Hartenstein R., Ehrhart H.  
Resistenztestung maligner Tumore  
Münch.Med. Wschr. 120, Nr. 21, 725 - 728 (1978)

- 85 Quastler H., Sherman F.G.  
Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse  
Exptl. Cell Res. 17, 420 - 438 (1959)
- 86 Queißer W.  
Zellkinetische Techniken - Zytophotometrie  
in: Das Knochenmark, Hsgb.: Queißer W.,  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978), 54 - 59
- 87 Rabes H.M., Iseler G., Czichos S., Tuzek H.V.  
Synchronization of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of Hydroxyurea  
Canc. Res. 37, 1105 - 1111 (1977)
- 88 Rajewski M.F.  
Synchronization in vivo: kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with Hydroxyurea  
Exp. Ce. Res. 60, 269 - 276 (1970)
- 89 Rajewski M.F.  
Proliferative parameters of mammalian cell systems and their role in tumor growth and carcinogenesis  
Z.Krebsforsch. 78, 12 - 30 (1972)
- 90 Rajewski M.F., Grüneisen A., Remmer I.  
Modification of proliferative parameters by temporary inhibition of DNA synthesis  
in: Studia biophysica, Band 31/32,  
Berlin (Ost) (1972), 367 - 374
- 91 Rajewski M.F., Hülser D.F., Fabricius E.  
Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA - Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen  
Z.Krebsforsch. 76, 266 - 292 (1971)
- 92 Ramseier H.P., Burkhalter M., Gautschi J.R.  
Survival of CHO cells that replicated DNA in the presence of Hydroxyurea  
Exp. Cell Res. 105, 445 - 453 (1977)
- 93 Renner E.  
Mathematisch - statistische Methoden in der praktischen Anwendung  
Berlin und Hamburg (1970)

- 94 Rickard K.A., Shaddock R.K., Howard D.E., Stohlmann Jr. F.  
A differential effect of Hydroxyurea on hemopoietic  
stem cell colonies in vitro and in vivo  
Proc.Soc.exp. Biol. (N.Y.) 134, 152 - 156 (1970)
- 95 Rosenkranz H.S.  
Some biological effects of Carbamoyloxyurea, an  
oxidation product of Hydroxyurea  
J.bacteriol. 102, 20 - 23, (1970)
- 96 Rosenkranz H.S., Pollack R.D., Schmidt R.M.  
Biological effects on Ischdroxyurea  
Canc. Res. 29, 209 - 219 (1969)
- 97 Roti Roti J.L., Dethlefsen L.A.  
Matrix simulation of duodenal crypt cell kinetics:  
II. cell kinetics following Hydroxyurea  
Cell Tissue Kinet. 8, 335 - 353 (1975)
- 98 Sachs L.  
Statistische Methoden  
Berlin (1979)
- 99 Sauer H., Pelka R., Wilmanns W.  
Zur Pharmakokinetik von Hydroxyharnstoff und seine An-  
wendung bei der Therapie von akuten myeloischen Leukämien  
unter Ausnutzung von Synchronisations- und Recruitment-  
Effekten  
Klin. Wochenschr. 54, 203 - 209 (1976)
- 100 Schertz G.L., Marsh J.C.  
Applications of cell kinetic techniques to human  
malignancies  
Chemotherapy 5, 29 - 58 (1977)
- 101 Schreml W., Bock O., Bock E., Heit W., Kubanek B.  
Different action of suicidal doses of tritiated thymi-  
dine and Hydroxyurea on murine haemopoietic cells  
Cell Tissue Kinet. 7, 517 - 527 (1974)
- 102 Schubert J.  
Nachweisverfahren und Separationsmöglichkeiten  
menschlicher hämopoetischer Stammzellen  
in: Das Knochenmark, Hsgb.: Queißer W.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978), 25 - 26
- 103 Schultze B.  
Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und  
Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm  
Habilitationsschrift an der Universität Würzburg (1967)

- 104 Schwartz J.H., Canellos G.P.  
Hydroxyurea in the management of the hematologic complications of chronic granulocytic leukemia  
Blood, Vol. 46, No. 1, 11 (1975)
- 105 Schwartz J.S., Garofalo M., Steinberg S.S., Philip F.S.  
Hydroxyurea: inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver of rats  
Ibid. 25, 1867 - 1872 (1965)
- 106 Sinclair W.K.  
Hydroxyurea: differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle  
Science 24, 1729 - 1731 (1965)
- 107 Sinclair W.K.  
Hydroxyurea: effects on chinese hamster cells grown in culture  
Canc. Res. 27, Part 1, 297 - 308 (1967)
- 108 Singer R.M., Gelfant S.  
Continuous inhibition of DNA synthesis in mouse ear epidermis using Hydroxyurea  
Exp. Cell Res. 73, 270 (1972)
- 109 Standen G., Philip M.A., Fletcher J.  
The proliferative state of granulocytic progenitor cells in human blood and marrow  
Cell Tissue Kinet. 13, 105 - 113 (1980)
- 110 Steel G.G., Lamerton L.F.  
The growth rate of human tumors  
Brit. J. Cancer 20, 74 - 86 (1966)
- 111 Sunkara P.S., Rao P.N., Nishioka K.  
Putrescine biosynthesis in mammalian cells: essential for DNA synthesis but not for mitosis  
Biochem.a.Biophys.Res.Comm. Vol.74, No.3, 1125-1133 (1977)
- 112 Tomita K., Plager J.E.  
In vivo cell cycle synchronisation of the murine sarcoma 180 tumor following alternating periods of Hydroxyurea blockade and release  
Canc. Res. 39, 4407 - 4411 (1979)
- 113 Tubiana M.  
The kinetics of tumorcell proliferation and radiotherapy  
British J. of Radiology 44, 325 - 347 (1971)

- 114 Tubiana M., Frindel E., Vassort F.  
Critical survey of experimental data on in vivo  
synchronisation by Hydroxyurea  
in: The Ambivalence of Cytostatic Therapy, Ed.: Grund-  
mann E., Gross R.  
Berlin (1978), 187 - 205
- 115 Van Putten L.M., Keizer H.J., Mulder H.J.  
Perspectives in cancer research: synchronization in  
tumor chemotherapy  
Europ. J. Cancer Vol. 12, 79 - 85 (1976)
- 116 Vassort F., Frindel E., Tubiana M.  
Effects of Hydroxyurea on the kinetics of colony  
forming units of bone marrow in the mouse  
Cell Tiss. Kinet. 4, 423 - 431 (1971)
- 117 Vesco C., Penman S.  
Purified cytoplasmatic DNA from HeLa cells: resistance  
to inhibition by Hydroxyurea  
Biochem. biophys. Res. Comm. 35, 249 - 257 (1969)
- 118 Vogel W., Schrempp W., Sigwarth I.  
Comparison of thymidine, fluorodeoxyuridine, Hydroxy-  
urea and methotrexate blocking at the G1/S phase  
transition of the cell cycle, studied by replication  
patterns  
Hum. Genet. 45, 193 - 198 (1978)
- 119 Vogler W.R., Horwitz S., Groth D.P.  
Studies on the effect of Hydroxyurea and other anti-  
cancer drugs upon pyrimidine metabolism  
Canc. Res. 29, 1371 - 1378 (1969)
- 120 Volm M.  
Die Synchronisation als ergänzendes Therapieprinzip  
bei der Behandlung maligner Tumore: Theoretische und  
tierexperimentelle Grundlagen  
Therapiewoche 27, 8009 - 8018 (1977)
- 121 Volm M., Krieg L., Mattern J., Wayss K.  
Effect of synchronization on chemotherapy of solid  
transplanted tumors  
Europ. J. Cancer Vol. 13, 1099 - 1108 (1977)
- 122 Walker I.G., Yatscoff R.W., Sridhar R.  
Hydroxyurea: induction of breaks in template strands  
of replicating DNA  
Biochem. a. Biophys. Res. Comm. Vol. 77, No. 1  
403 - 408 (1977)

- 123 Walters R.A., Tobey R.A., Hildebrand C.E.  
Hydroxyurea does not prevent synchronized G1 chinese hamster cells from entering the DNA synthetic period  
Biochem. a. Biophys. Res. Comm. Vol. 69, No. 1,  
212 - 217 (1976)
- 124 Wannenmacher M., Esser E., Glupe J., Schuhmann J.  
Klinische und experimentelle Untersuchung zur Strahlen-  
behandlung inoperabler Tumore nach Teilsynchronisation  
mit Bleomycin  
Strahlenther. 147, 1 - 9 (1974)
- 125 Wayss K., Mattern J., Volm M.  
Strahlentherapie solider Walker-Karzinom Sarkome nach  
Synchronisation mit Hydroxyharnstoff  
Strahlenther. 156, 41 - 45 (1980)
- 126 Wilmanns W., Sauer H., Wilms W.  
Untersuchungen der DNS-Synthese als Grundlage für eine  
rationale Kombinationsbehandlung bei akuten Leukämien  
Sonderdruck aus: Klinische Pharmakologie und experi-  
mentelle Therapie, 4. Kolloquium Göttingen, Hsbg:  
Vogt W., Bock H.E.,  
Aulendorf (1976), 3 - 19
- 127 Wilmanns W., Wilms K., Rajewski M.F.  
Biochemische Grundlagen der Behandlung von Leukosen  
Sonderdruck aus: Leukämie, Hsbg.: Gross R., Van de Loo J.  
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972)
- 128 Worthington D.H., Nachtwey D.S.  
Hydroxyurea: use in determining the duration of G 2 in  
tetrahymena  
Cell Tissue Kinet. 9, 469 - 478 (1976)
- 129 Yarbrow J.W.  
Further Studies on the mechanism of action of Hydroxy-  
urea  
Canc.Res. 28, 1082 - 1087 (1968)
- 130 Young Ch.W., Hodas S.  
Hydroxyurea: inhibitory effect on DNA metabolism  
Science 146, 1172 - 1174 (1964)
- 131 Young Ch.W., Schochetman G., Karnofsky A.  
Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide  
synthesis: studies in intact cells  
Canc. Res. 27, Part 1, 526 - 534 (1967)

- 132 Young R.C., Rosenoff S.A., Myers C.E., Brereton H.,  
Chabner B.A.
- Alterations in DNA synthesis induced by chemotherapeutic agents in vivo: potential applications to clinical treatment schedules
- in: Growth Kinetics and Biochemical Regulation of Normal and Malignant Cells, Eds.: Drewinko B., Humphrey R.M.
- Baltimore (1976), 787 - 809

ABKÜRZUNGEN

|                |                                                                                              |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14 C           | Radioaktives Isotop des Kohlenstoffs                                                         |
| CFUc           | Colony Forming Units in colonies, granulopoetisch determinierte Stammzellen des Knochenmarks |
| CPM            | Counts per Minute                                                                            |
| CSF            | Colony Stimulating Factor                                                                    |
| DNS            | Desoxyribonucleotidsäure                                                                     |
| 3 H            | Radioaktives Isotop des Wasserstoffs, Tritium                                                |
| 3 H - TdR      | Tritiummarkiertes Thymidin                                                                   |
| HU             | Hydroxyurea, Hydroxyharnstoff                                                                |
| HWZ            | Halbwertszeit                                                                                |
| KM             | Knochenmark                                                                                  |
| M              | Mol                                                                                          |
| M / E          | Myelopoese - Erythropoese - Quotient                                                         |
| MHK            | Minimale Hemmkonzentration                                                                   |
| MNZ            | Mononukleare Zellen                                                                          |
| ODC            | Ornithindecarboxylase                                                                        |
| PCA            | Perchlorsäure                                                                                |
| RPG            | Ringer - Phosphat - Glukose - Lösung                                                         |
| t <sub>c</sub> | Generationszeit                                                                              |
| t <sub>s</sub> | S - Phasen - Dauer                                                                           |

DANKSAGUNG

Herrn Priv. - Doz. Dr. med. Reiner Hartenstein danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und für die jederzeit tatkräftige und aufmunternde Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. W. Wilmanns bin ich für die Übernahme des Coreferates zu Dank verpflichtet.

Besonders möchte ich mich bei Fr. Carola Misera bedanken, ohne deren, mit Engagement geleisteten technischen Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Frau Renate Fleischer - Pelka von der Abteilung für Hämatologie des Institutes für Strahlen- und Umweltforschung in München für die Durchführung der zytophotometrischen Untersuchungen, sowie Herrn Dr. med. L. Böning und Fr. Ch. Lempferdt vom gleichen Institut für die CFU - C - Untersuchungen.

Für die statistische Beratung bedanke ich mich bei Fr. Schubert vom Institut für medizinische Datenverarbeitung (ISB) der Universität München.

LEBENS LAUF

Am 17.12.1953 wurde ich als zweiter Sohn des Kreiskämmerers Andreas Ertl und seiner Ehefrau Rosa Ertl, geb. Wendl, in Dorfen/Oberbayern geboren.

Ab 1960 besuchte ich die Volksschule in Erding. Im Jahr 1964 trat ich in das Gymnasium Erding über, wählte ab der 9. Klasse den neusprachlichen Zweig und legte meine Reifeprüfung im Jahr 1973 ab.

Im Wintersemester des gleichen Jahres begann ich das Medizinstudium an der Ludwig - Maximilians - Universität München. Im Praktischen Jahr arbeitete ich an der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern, im Kreiskrankenhaus Starnberg und im Bezirkskrankenhaus Haar bei München.

Die abschließende dritte ärztliche Prüfung legte ich im Mai 1980 ab, die Approbation erhielt ich im Juni 1980. Seit November 1980 leiste ich meinen Grundwehrdienst als Stabsarzt in Hamburg und Brannenburg/Inn. Verheiratet bin ich seit März 1981.













